



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Desarrollo, caracterización y evaluación de formas farmacéuticas de uso en piel y mucosas que vehiculicen extractos vegetales con actividad antimicrobiana

Tesis Doctoral

Tesista: Pérez Zamora, Cristina Marisel – Farmacéutica

Director: Prof. Dr. Diego Chiappetta

Departamento de Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires (UBA)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Co-Director: Prof. Dra. María Beatriz Nuñez

Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas – Carrera de Farmacia

Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS)

Área de investigación: Farmacia y Bioquímica

Sub-área de investigación: Ciencias Farmacéuticas

Fecha de admisión: 10 de diciembre de 2013

Expediente: 0064617/13

Año 2018

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a la Dra. María B. Nuñez y la Dra. Carola A. Torres, porque ambas fueron muy importantes en mi formación profesional, me han brindado apoyo y motivación fundamental en mi formación de posgrado; y les agradezco por permitirme ser parte de este hermoso equipo de investigación en el área de productos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió seguir esta carrera de posgrado.

A la UNCAus por permitir que realice el trabajo de investigación en sus instalaciones mediante los proyectos financiados por la institución.

A mis directores por confiar en mí, apoyarme, guiarme y acompañarme en este proceso de formación.

A la Dra. Carola Torres, primero por estimularme a seguir este camino, segundo por ayudarme las veces que necesité de ella, ya sea para consulta, realización de ensayos microbiológicos o análisis de los resultados obtenidos.

Al Farmacéutico Alberto José Bela por asesorarme en el proceso de extracción de aceites esenciales.

A la Dra. Ana González por tomarse el tiempo de tomar las fotografías microscópicas de los geles en su Laboratorio de Anatomía Vegetal- IBONE (UNNE-CONICET).

Al Dr. Ariel Michaluk por su colaboración con las determinaciones de textura de geles y resistencia a la rotura de películas.

A los ingenieros, docentes y colegas de la UNCAus en general por colaborar en distintas instancias cada vez que necesité de ellos.

A la Dra. Viviana Mouriño y Dra. Claudia Salerno por su colaboración en los ensayos de permeación.

A la Dra. Marcela Moretton por su colaboración en las determinaciones de viscosidad.

A mi novio Ariel Puertas por el acompañamiento, la paciencia y tolerancia durante estos años de estudio.

A mis abuelos por alentarme a superarme día a día, a seguir estudiando, y en especial a mi abuela Rosa, que con 80 años me acompañó a cosechar plantas de *Lippia alba*, en medio del campo, con mosquitos, cruzando alambrados y cargando sobre sus hombros bolsas llenas de plantas.

A mis tíos Juan Flores y Maruca Cervantes por permitirme cosechar plantas de *Lippia turbinata* de su campo.

A mis padres por apoyarme en esta carrera, y junto a mis hermanos por ayudarme a cosechar y limpiar las plantas cuando necesité.

RESUMEN

El uso de plantas para curar enfermedades y cicatrizar heridas es una costumbre que data de miles de años y una herencia de las antiguas civilizaciones. A pesar de que una importante proporción de la biodiversidad vegetal del planeta se encuentra en el continente americano, son muy pocos los productos farmacéuticos desarrollados a partir de ella. Esta tesis tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar formulaciones de aplicación tópica (geles, emulgeles y películas), para su uso en piel y mucosas, que vehiculicen una combinación de extractos vegetales con actividad antibacteriana y antiinflamatoria. Los extractos hidroalcohólicos de *Lippia turbinata* Griseb. y *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown se obtuvieron mediante lixiviación; se hizo la caracterización físico-química, se cuantificó el contenido de fenoles totales, se evaluó la actividad antibacteriana y antiinflamatoria de los extractos solos y su combinación. Los excipientes empleados para las formulaciones en gel y emulgel fueron: Carbopol® 934 y 940, Pemulen™ TR1 y TR2, Politráp®, Sepigel® 305, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, Ceral PW, Ceral 10, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol cetoestearílico, ácido oleico, glicerina, propilenglicol. Al producto terminado se le realizó una caracterización de las propiedades físicas: características organolépticas, extensibilidad, viscosidad, pH, conductividad, perfil de textura, permeación y análisis microbiológico. En el caso de las películas se empleó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), distintos tipos de Eudragit®, propilenglicol, glicerina, sorbitol y sacarina. Se realizó la caracterización mediante evaluación del aspecto, contenido de polifenoles, estudio de liberación, índice de humectación, resistencia a la rotura, espesor, mucoadhesividad y permeación. Luego fueron sometidos a estudios de estabilidad en distintas condiciones de temperatura y humedad. Los emulgeles probados no fueron estables, presentaron separación de fases, por lo que no fueron seleccionados para continuar su estudio. De los geles formulados, el gel con Sepigel® al 4% (p/p) presentó mejor aspecto, olor característico de las especies vegetales, de color marrón, sin presencia de grumos y con buena extensibilidad. Los geles tuvieron una permeación *in vitro* de la piel porcina de hasta un 30% y baja retención en el epitelio de ensayo (<15%). Además, no presentaron contaminación microbiana y fueron estables durante 18 meses. Con respecto a las formulaciones tipo película, el excipiente HPMC al 1% (p/p) fue el más adecuado para el fin propuesto. La película resultante presentó una superficie de apariencia lisa, brillante, de color marrón, inodora, dulce y con sabor característico de los extractos vegetales. También conservó la actividad antibacteriana de los extractos, siendo estable en ambiente fresco (entre 8 y 25 °C) y seco (<58% humedad relativa). Las películas mostraron baja permeabilidad *in vitro* en mucosa oral porcina ($\leq 13\%$), con mayor porcentaje de retención en el epitelio ($\leq 43\%$). Las películas no presentaron contaminación microbiológica durante 24 meses. Estos resultados demuestran la factibilidad de vehiculizar el extracto en una formulación de tipo gel y en películas, logrando conservar el efecto antibacteriano del extracto y manteniendo la estabilidad en el tiempo sin el uso de conservantes antimicrobianos.

SUMMARY

The use of plants to cure diseases and heal wounds is a custom that dates back thousands of years and a legacy of ancient civilizations. Although a significant proportion of the planet's plant biodiversity is found on the American continent, very few pharmaceutical products developed from it. This thesis aimed to develop and characterize topical application formulations (gels, emulgels and films), for use on skin and mucosa, and to transport a combination of plant extracts with antibacterial and anti-inflammatory activity. Hydroalcoholic extracts of *Lippia turbinata* Griseb. and *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown were obtained by leaching; the physical-chemical characterization was made, the content of total phenols was quantified, the antibacterial and anti-inflammatory activity of the extracts alone and their combination were evaluated. The excipients used for the gel and emulgel formulations were: Carbopol® 934 and 940, Pemulen™ TR1 and TR2, Politrax®, Sepigel® 305, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxyethylcellulose, Ceral PW, Ceral 10, stearyl alcohol, cetyl alcohol, cetostearyl alcohol, oleic acid, glycerin, propylene glycol. The finished product was characterized by physical properties: organoleptic characteristics, extensibility, viscosity, pH, conductivity, texture profile, permeation, and microbiological analysis. In the case of films, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), different types of Eudragit®, propylene glycol, glycerin, sorbitol, and saccharin were used. Characterization was carried out by evaluating the appearance, polyphenol content, release study, wetness index, tear strength, thickness, mucoadhesiveness, and permeation. Then, they were subjected to stability studies in different conditions of temperature and humidity. The tested emulgels were not stable; they presented phase separation, so they were not selected to continue their study. Of the gels formulated, the gel with Sepigel® at 4% (w/w) presented a better appearance; a characteristic smell of plant species, brown, without the presence of lumps and with good extensibility. The gels had an *in vitro* permeation of porcine skin of up to 30% and low retention in the test epithelium (<15%). Besides, they did not present microbial contamination and were stable for 18 months. Concerning the film-type formulations, the excipient HPMC 1% (w/w) was the most suitable for the proposed purpose. The resulting film presented a smooth, glossy surface, brown, odorless, sweet and with characteristic flavor of plant extracts. It also preserved the antibacterial activity of the extracts, being stable in fresh (between 8 and 25°C) and dry environment (<58% relative humidity). The films showed low *in vitro* permeability in the porcine oral mucosa (<13%), with a higher percentage of retention in the epithelium (≤43%). The films did not show microbiological contamination for 24 months. These results demonstrate the feasibility of transporting the extract in a gel formulation and films, managing to preserve the antibacterial effect of the extract and maintaining stability over time without the use of antimicrobial preservatives.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.3 Objetivo general.....	3
2.3.1 Objetivos específicos.....	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Estructura y función de la piel.....	5
3.2 Microbiota normal de la piel	7
3.3 Infecciones estafilocócicas y estreptocócicas de la piel	8
3.4 Mucosa bucal.....	10
3.5 Afecciones de la mucosa oral	13
3.6 Resistencia a antibióticos	14
3.7 Productos naturales en terapia medicinal y el problema de su estandarización	15
3.8 Plantas medicinales como alternativa a antibióticos	17
3.8.1 Especies vegetales usadas en esta tesis.....	17
<i>Lippia turbinata</i> (Griseb).....	18
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	18
3.9 Dificultad tecnológica para vehiculizar extractos vegetales	20
3.10 Formas farmacéuticas de aplicación tópica	20
3.10.1 Geles.....	20
3.10.1.1 Descripción de los polímeros usados.....	21
3.10.2 Emulgeles	23
3.10.2.1 Descripción de sustancias empleadas en la fase oleosa de las emulsiones estudiadas	24

3.10.2.2 Descripción de tensioactivos empleados	25
3.11 Formas de administración en la cavidad bucal	25
3.12 Sistemas mucoadhesivos	27
3.13 Teoría sobre la mucoadhesión	28
3.13 Polímeros para sistemas mucoadhesivos.....	29
3.15 Evaluación de formas farmacéuticas	29
3.16 Estudios de estabilidad	33
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	35
4.1 Recolección del material vegetal	35
4.2 Obtención de los extractos vegetales	36
4.2.1 Aceite esencial	36
4.2.2 Extracto hidroalcohólico	37
4.3 Caracterización del material vegetal	38
4.3.1 Determinación del quimiotipo de las especies vegetales	38
4.3.2. Identificación de compuestos no volátiles en las especies vegetales	38
4.3.3 Determinación del rendimiento de los extractos.....	45
4.3.4 Determinación del pH.....	45
4.3.5 Determinación de la densidad	45
4.4 Determinación del poder antimicrobiano de los extractos.....	45
4.4.1. Técnica de microdilución en caldo	46
4.4.2 Técnica del tablero de ajedrez	48
4.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los extractos	48
4.6 Desarrollo y selección de los geles y emulgeles.....	51

4.7 Caracterización de los hidrogeles y emulgeles.....	55
4.7.1 Evaluación de caracteres organolépticos.....	55
4.7.2 Evaluación de la homogeneidad	55
4.7.3 Evaluación de la extensibilidad	55
4.7.4 Evaluación de la textura.....	56
4.7.5 Determinación de la viscosidad.....	57
4.7.6 Medición de pH y conductividad.....	57
4.7.7 Determinación del poder antimicrobiano	57
4.7.8 Control higiénico	58
4.8 Estudio de estabilidad de los geles.....	59
4.8.1 Evaluación de la estabilidad física	59
4.8.2 Evaluación de la estabilidad química	60
4.8.3 Evaluación de la estabilidad microbiológica	60
4.9 Estudio de permeación <i>in vitro</i> de polifenoles en geles	60
4.10 Preparación y selección de las películas	62
4.11 Caracterización de las películas bucales	67
4.11.1 Caracterización organoléptica.....	67
4.11.2 Determinación de homogeneidad	67
4.11.3 Medición de pH	67
4.11.4 Medición del espesor	67
4.11.5 Determinación de las propiedades mecánicas.....	67
4.11.6 Determinación de la resistencia al doblamiento	68
4.11.7 Determinación del índice de humectación.....	69
4.11.8 Determinación del contenido de humedad	69

4.11.9 Estudio de liberación <i>in vitro</i>	70
4.11.10 Determinación de las propiedades mucoadhesivas <i>in vitro</i>	70
4.11.11 Determinación del poder antimicrobiano	72
4.12 Estudio de la estabilidad de las películas	72
4.12.1. Evaluación de la estabilidad física.....	72
4.12.2. Evaluación de la estabilidad química	73
4.12.3. Evaluación de la estabilidad microbiológica	73
4.13 Estudio de permeación <i>in vitro</i> de polifenoles en películas.....	74
Determinación del Coeficiente de Reparto (Q).....	75
4.13 Análisis estadístico	76
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
5.1 Composición de los aceites esenciales	77
5.2 Caracterización de extractos vegetales	83
5.3 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	87
5.4 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	89
5.5 Resultados de las formulaciones de hidrogeles y emulgeles.....	92
5.5.1 Geles de Carbopol®	92
5.5.2 Geles con derivados de celulosas.....	93
5.5.3 Geles con Sepigel®	94
5.5.4 Emulgeles	95
5.6 Evaluación de las formulaciones de hidrogeles seleccionados	95
5.7 Resultados del estudio de estabilidad de los geles	109
5.8 Resultados de las formulaciones de uso en mucosa oral: Películas	121

5.9 Características de las películas bucales seleccionadas	123
5.10 Evaluación de la estabilidad de las películas bucales	138
5.11 Control higiénico en el tiempo.....	141
6. CONCLUSIONES	143
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	145
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
9. TRABAJOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS	165
9. 1 Trabajos en revista científicas	165
9.2 Resúmenes presentados en eventos Científicos-Tecnológicos publicados en libros de resúmenes	165
9.3 Trabajos presentados en eventos científicos tecnológicos no publicados	166

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas, para curar enfermedades y cicatrizar heridas, es una costumbre que data de miles de años y una herencia de las antiguas civilizaciones. A pesar de que una importante proporción (aproximadamente 30%) de la biodiversidad vegetal del planeta se encuentra en el continente americano (Desmarchelier, 2012; Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo, 2013), son muy pocos los productos farmacéuticos desarrollados a partir de ella y de importancia para los mercados del mundo industrializado.

La población, sobre todo, en los sectores más desprotegidos y en ámbitos rurales recurre muy frecuentemente al uso de plantas consideradas popularmente medicinales para atender sus problemas de salud. El elevado costo de los medicamentos contribuye a fortalecer esta tendencia. Cuando faltan recursos económicos para adquirir una especialidad medicinal, las familias recurren frecuentemente a "las fórmulas y recetas del campo". Independientemente de su eficacia, se trata de costumbres muy arraigadas (PROSISA, 2005).

En las últimas décadas, el conocimiento empírico del uso de las plantas medicinales -en la mayoría de los casos gracias a su utilización por los pueblos originarios- comenzó a encontrar un sustento científico a través de disciplinas como la química, la farmacología, la investigación clínica y la toxicología. El estudio sobre las virtudes terapéuticas, tomando como base los conocimientos etnobotánicos, permite progresar hacia el desarrollo de formulaciones medicinales a base de extractos vegetales. La vinculación del saber popular con el saber científico, basado en la experimentación, podrá dar un valor adicional a los conocimientos populares y a las especies vegetales de estudio, permitiendo aprovechar las plantas como un recurso, revalorizando su aplicación para el cuidado de la salud.

El proceso de pasar de la planta al medicamento final no es una tarea sencilla, requiere de estudios de pre-formulación y de estabilidad del producto desarrollado en distintas condiciones, así como la estandarización del extracto como materia prima, el estudio de la compatibilidad y estabilidad del extracto con los distintos excipientes de una formulación, como la selección de la forma farmacéutica más apropiada para el uso dado. Además, las características de los extractos dependerán del proceso de extracción, no siendo lo mismo vehiculizar una infusión, un macerado, un extracto etanólico o glicólico, o un aceite esencial.

Este estudio se basó en la hipótesis de que la vehiculización de extractos vegetales con probada actividad antibacteriana en formas farmacéuticas semisólidas y sólidas, de aplicación tópica, como ser hidrogeles, emulgeles y películas, permitirá obtener formulaciones con características organolépticas aceptables, con estabilidad física, química y microbiológica adecuada, y con actividad antibacteriana y antiinflamatoria.

Esta tesis se estructura en 7 capítulos, donde luego de esta breve introducción (capítulo 1) encontrará los objetivos (capítulo 2).

En el marco teórico (capítulo 3) se realiza una exposición de los conceptos teóricos necesarios para abordar el estudio y desarrollo de esta tesis, como ser: estructura de piel y sus afecciones, estructura de las mucosas y sus afecciones, el rol de los productos naturales en la medicina, la problemática de la estandarización de extractos vegetales y la dificultad para su vehiculización en una forma farmacéutica; formas farmacéuticas de uso tópico en piel y mucosas; caracterización y estudios de estabilidad de productos farmacéuticos.

En el capítulo 4 se describe la metodología empleada para el desarrollo de las formulaciones estudiadas, su caracterización y la evaluación de la estabilidad en el tiempo, así como el estudio de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria mediante técnicas *in vitro*.

En el capítulo 5 se presentan los resultados de los ensayos antes mencionados y la discusión sobre los mismos.

Finalmente, con la información recopilada en la tesis se elaboraron las conclusiones (capítulo 6) y se proponen las perspectivas futuras de este trabajo (capítulo 7).

En general se puede distinguir que el trabajo se organiza en 3 núcleos temáticos principales: la obtención y caracterización del extracto, el desarrollo y evaluación de geles, y el desarrollo y evaluación de las películas.

2. OBJETIVOS

2.3 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar formulaciones de aplicación tópica (geles, emulgeles y películas), para uso en piel y mucosas, que vehiculicen una combinación de extractos vegetales con actividad antibacteriana y antiinflamatoria, y evaluar su estabilidad en el tiempo.

2.3.1 Objetivos específicos

- Preparar y caracterizar los extractos de las especies *Lippia turbinata* Griseb. y *L. alba* (Mill.) N. E. Brown.
- Determinar la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* de la combinación de los extractos vegetales.
- Desarrollar geles que contengan ambos extractos empleando diferentes poliacrilatos, derivados de celulosas como gelificantes para aplicación en piel.
- Desarrollar geles que contengan ambos extractos empleando gelificantes relativamente más novedosos como Sepigel® 305, Pemulen™ PR1 y PR2, Polytrap® 6603 para aplicación en piel.
- Caracterizar las formulaciones mediante la evaluación de los caracteres organolépticos, homogeneidad, extensibilidad, textura, viscosidad y pH.
- Desarrollar películas (*films*) que contengan ambos extractos, para aplicar en la mucosa oral.
- Caracterizar las formulaciones de películas mediante la evaluación de los caracteres organolépticos, homogeneidad, pH, espesor, resistencia a la rotura, resistencia al doblamiento, capacidad de hinchamiento y mucoadhesividad.
- Estudiar cómo afecta a las propiedades físicas, la inclusión de los extractos en las formulaciones de gel.
- Estudiar la estabilidad físico-química de las formulaciones en gel, emulgel y películas durante 24 meses.
- Estudiar la estabilidad microbiológica de los geles, emulgeles y películas durante 24 meses.
- Estudiar las propiedades antibacterianas de los geles, emulgeles y películas en el tiempo.
- Seleccionar la formulación que presenta las propiedades más adecuadas para el uso propuesto.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Estructura y función de la piel

La piel es el órgano más extenso y accesible del cuerpo humano, el cual proporciona el 10% de la masa corporal y tiene una superficie aproximada de $1,8 \text{ m}^2$ (Lozano, Córdoba, & Córdoba, 2012).

Consta de dos partes principales: la epidermis (epi-, de *apí*, por encima), porción más fina y superficial, compuesta por tejido epitelial, y la dermis, que es la parte profunda, más gruesa del tejido conectivo. Debajo, pero sin formar parte de la piel, está el tejido subcutáneo, también llamado hipodermis (hipo-, de *hypó*, debajo). El tejido subcutáneo sirve como depósito de reserva de grasas y contiene numerosos vasos sanguíneos que irrigan la piel y terminaciones nerviosas sensibles a la presión (Tortora & Derrickson, 2011).

Epidermis

Está compuesta por un epitelio plano estratificado queratinizado, el cual posee un espesor aproximado de $150 \text{ }\mu\text{m}$. Contiene cuatro tipos principales de células: i) queratinocitos, ii) melanocitos, iii) células de Langerhans y iv) células de Merkel.

Varias capas de queratinocitos en distintos estadios de desarrollo forman la epidermis, la cual tiene cuatro capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y un estrato córneo fino.

El estrato basal es la capa más profunda de la epidermis, compuesto por una sola hilera de queratinocitos cilíndricos. Los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel están dispersos entre los queratinocitos de la capa basal.

Por encima está el estrato espinoso, formado por ocho a diez capas de queratinocitos, dispuestos en estrecha proximidad. Estas células tienen los mismos orgánulos que las del estrato basal.

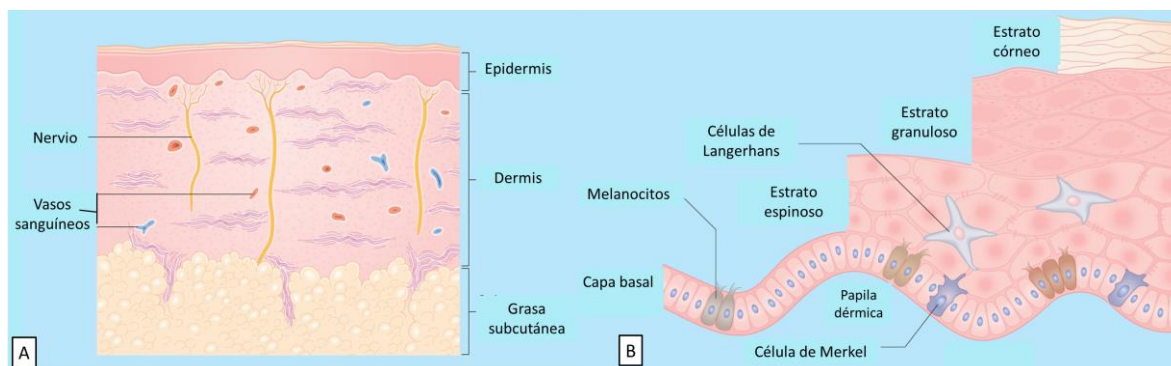


Figura 1. Estratos de la piel (A) y estratos de la dermis (B). Adaptado de Marks, Miller, Marks, & Miller (2019)

El estrato granuloso (de gránulo, diminutivo de grano) situado en el medio de la epidermis, consta de 3 a 5 capas de queratinocitos aplanados que sufren apoptosis. El núcleo y otros orgánulos de las células comienzan a degenerarse y los tonofilamentos se hacen más evidentes. Luego, aparecen gránulos oscuros de una proteína llamada queratohialina, que convierte los tonofilamentos en queratina. También están presente los gránulos laminares rodeados de membrana, que liberan una secreción rica en lípidos. Esta secreción ocupa los espacios entre las células del espacio granuloso, el estrato lúcido y el estrato córneo, la cual es rica en lípidos y actúa como un sellador de materiales extraños. Este estrato marca una transición entre la capa profunda, metabólicamente activa, y las capas más superficiales de células muertas.

El estrato córneo (de *corneus*, en forma de cuerno) está constituido por 25 a 30 capas de queratinocitos muertos aplanados, que se descaman continuamente y son reemplazados por células de los estratos más profundos. El interior de la célula contiene sobre todo, queratina. Sus múltiples capas ayudan a proteger a las capas más profundas de las lesiones y de la invasión microbiana. Este estrato tiene un espesor de 10 a 25 μm según esté seca o húmeda (Lozano et al., 2012).

Los corneocitos están unidos entre sí por bicapas lamelares lipídicas altamente estructuradas, compuestas principalmente por ceramidas, ácidos grasos libres, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos, que le dan a la capa córnea un aspecto de ladrillo y cemento. Es esta barrera la que limita la velocidad de penetración de los fármacos a través de la piel (Marcano & González, 2006).

Dermis

La dermis es la región más profunda de la piel y está formada principalmente por tejido conectivo, la cual posee un espesor aproximado de 3 a 5 mm, dependiendo de la parte del cuerpo. En esta capa se encuentran los vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos.

Las estructuras anexas de la piel (pelos, glándulas cutáneas y uñas) tienen muchas funciones importantes como por ejemplo: en el caso del pelo y uñas, proteger el cuerpo, y en el caso de las glándulas sudoríparas ayudar a regular la temperatura corporal. En las zonas de las plantas del pie o las huellas dactilares existe un estrato más llamado estrato lúcido, el cual se ubica entre el estrato córneo y el estrato granuloso (Tortora & Derrickson, 2011).

Entre las funciones de la piel se encuentran la protección del medio interno frente a determinadas agresiones externas, así como la regulación de la temperatura corporal, el mantenimiento del equilibrio hidroelectrico, la absorción de la radiación ultravioleta y la captación de las señales sensitivas (Marks et al., 2019). Una de las funciones más importantes es evitar la pérdida de agua y fluidos corporales, así como la regulación de la entrada de agentes externos, fundamentalmente ejercida por el estrato córneo.

Vías de penetración de la piel

Siempre que alguna sustancia tome contacto directo con la piel, existe la posibilidad de que una parte logre permearla y alcanzar la vía sistémica. Hay tres vías por las que una molécula puede penetrar a través de la piel: i) por los dominios lipídicos intercelulares, ii) vía transcelular o iii) vía apéndices. Estas vías no son mutuamente exclusivas, y es probable que la mayoría penetre en el estrato córneo por una combinación de ellas (Sánchez, 2013).

Aunque la ruta intercelular parece ser la vía difusional predominante para la mayoría de las moléculas que atraviesan la capa córnea, los agentes activos no polares entran en esta capa por la ruta intercelular, mientras que los polares lo hacen por la transcelular. Las glándulas sebáceas son más permeables que los corneocitos, por lo tanto, la unidad polisebácea constituye una vía alternativa que permite a los fármacos iónicos y moléculas polares grandes alcanzar la dermis, evitando la impenetrabilidad del estrato córneo (González Álvarez, Cabrera Pérez, & Bermejo Sanz, 2015).

3.2 Microbiota normal de la piel

La flora de la piel se compone de cocos aerobios, bacterias corineformes aerobias y anaerobias, bacterias Gram negativas y levaduras.

Estos microorganismos contribuyen a prevenir las infecciones de la piel al establecer una competencia ecológica con los microorganismos patógenos y al hidrolizar los lípidos del cebo generando ácidos grasos libres que resultan tóxicos para muchas bacterias. La ecología de regiones concretas de la piel está determinada por la humedad, la presencia de líquidos sebáceos y el entorno gaseoso (Pereira, 2014).

El coco más común de la piel humana es el *Staphylococcus epidermidis*, pero también se pueden encontrar *S. saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *M. roseus*, *M. varians*. A pesar de que se debate si *S. aureus* es, o no, un verdadero residente de la piel o un contaminante, este suele encontrarse en la región anterior de las narinas (en el 35% de la población), en el periné (en el 20%), y en las axilas y los pliegues interdigitales de los pies (entre el 5 y 10%) (Millet, Halpern, Reboli, & Heymann, 2016).

Las bacterias corineformes aerobias suelen encontrarse en la zona de intertrigo, mencionándose las siguientes: *Corynebacterium minutissimum*, *C. lipophilicus*, *C. xerosis*, *C. jeikeium* y *Brevacterium epidermidis*. En el caso de las anaerobias encontramos: *Propionibacterium acnes*, *P. granulosum* y *P. avidum*, las cuales se encuentran en glándulas sebáceas y folículos pilosos. Por otro lado, la bacteria Gram negativa habitual en piel es el *Acinetobacter spp.*, el cual se localiza en axilas, periné y fosas antecubitales (Millet et al., 2016; Thormar, 2011).

Por último, la *Malassezia furfur* es una levadura y se encuentra en la piel con abundantes glándulas sebáceas (Millet et al., 2016).

De todas las mencionadas, se ha centrado la atención en los cocos aerobios, debido a que estos generan las infecciones conocidas como infecciones estafilocócicas y estreptocócicas.

3.3 Infecciones estafilocócicas y estreptocócicas de la piel

A continuación se realiza una breve descripción de las infecciones de piel que son de interés para el estudio de esta tesis.

Impétigo

El impétigo es una infección superficial y frecuente de la piel, que puede adoptar una forma ampollosa o no. La forma no ampollosa supone el 70% de los casos. En esta, el patógeno más frecuente es el *Staphylococcus aureus* (Pereira, 2014).

Suele darse en la infancia, sobre todo en menores de 6 años, los adultos lo contraen por contacto con los niños. Es sumamente contagioso y se extiende rápidamente por contacto directo entre personas o por fómites.

El impétigo no ampolloso se manifiesta en lugares de rascado, laceraciones o quemaduras; la alteración de la barrera cutánea hace que la bacteria invada, se adhiera y produzca la lesión.



Figura 2. Ampollas descamadas de impétigo ampolloso. Extraído de Pereira (2014).

El impétigo ampolloso suele ocurrir en una piel clínicamente intacta y se debe a la producción local de toxinas exfoliativas por el fago grupo II de *S. aureus*, la cual induce una acantólisis de la capa granular de la epidermis.

Se trata con medicación tópica (mupirocina al 2% o retapamulina 1% o ácido fusídico 2%), pero en caso de ser necesario se pueden llegar a realizar tratamientos orales o intravenosos (Millet et al., 2016).

Foliculitis bacteriana

Es una infección superficial o profunda del folículo piloso, siendo la causa más habitual el *S. aureus*. En personas con acné vulgar tratados por largos períodos de tiempo con antibióticoterapia oral suele aparecer foliculitis por Gram negativos (Vila & Puig, 2003). Suele afectar a la cara, sobre todo la zona de la barba, el tórax, la espalda, las axilas y las nalgas. Se manifiesta con pústulas pequeñas o pápulas costrosas sobre una base eritematosa y puede ser pruriginosa o dolorosa.

El tratamiento suele consistir en lavados con antibacterianos que contengan clorhexidina o triclosano y antibióticos por vía tópica, como mupirocina o clindamicina durante 7 a 10 días (Millet et al., 2016).

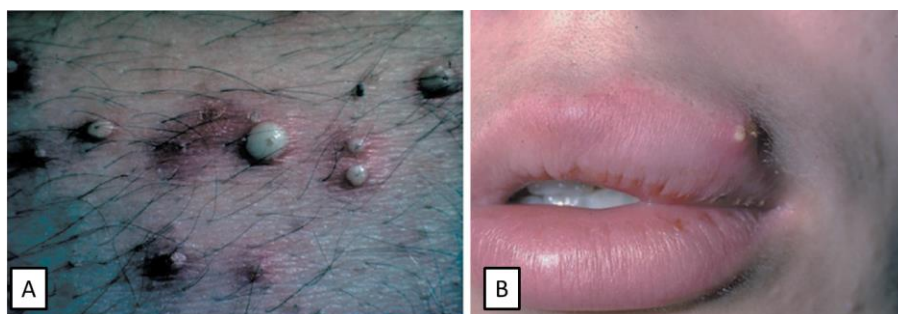


Figura 3. Imagen de foliculitis (A) y forúnculo (B). Imagen adaptada de Aragüés & González-Arriba, (2007).

Abscesos, forúnculos y ántrax

Suelen ocurrir en los adolescentes y adultos jóvenes. El microorganismo causal más habitual es el *S. aureus*, pero en ocasiones se pueden cultivar otras cepas. Los abscesos y forúnculos son colecciones de pus separadas del tejido vecino por una pared, que se inflaman. El absceso puede ocurrir en cualquier parte del organismo pero el forúnculo afecta, por definición, a un folículo piloso. La colección continua de forúnculos que se extiende en la profundidad del tejido subcutáneo se denomina ántrax (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015). En la superficie suelen apreciarse trayectos fistulosos que en ocasiones se ulceran.

Para las lesiones mayores, se recomienda tratamiento con antibióticos combinado con la incisión y drenaje en los casos que fuera posible.

Dado el alto porcentaje de forúnculos causado por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) se contempla cobertura empírica con antibióticos.

Dactilitis distal ampollosa

Es una infección localizada en el cojinete adiposo palmar de los dedos de la mano o del pie, y a veces puede afectar al pliegue ungueal o a la porción más próxima del dedo (de la Cueva & Herranz, 2007). Afecta sobre todo a niños de 2 a 16 años.

Las especies de *Streptococcus* del grupo A o *S. aureus* suelen ser los gérmenes causales. La inoculación puede seguir a un traumatismo local de la piel o la autoinoculación desde la nariz.

Síndrome de piel escaldada estafilocócica

Es una forma profunda de impétigo no ampollosa que se caracteriza por su extensión a la dermis produciendo úlcera fina (de la Cueva & Herranz, 2007). Se debe a la infección primaria por *S. pyogenes* o a la sobreinfección estreptocócica de una ulceración preexistente o de una picadura de insecto excoriada. El estado de portador crónico de *S. aureus* es un factor clave en todas las afecciones antes mencionadas.



Figura 4. Descamación de la piel en el brazo de un niño, causada por el síndrome de piel escaldada estafilocócica. Imagen tomada de Tsujimoto et al. (2018)

3.4 Mucosa bucal

Las mucosas tapizan las cavidades corporales que se hallan abiertas directamente al exterior. Constan de una capa de revestimiento epitelial y una capa subyacente de tejido conectivo. La capa epitelial de la mucosa es una característica importante de los mecanismos de defensa, porque constituye una barrera difícil de franquear para los microorganismos patógenos. El epitelio de las mucosas varía según la parte del cuerpo. La capa de tejido conectivo de la mucosa se llama lámina propia, contiene a los vasos sanguíneos y protege de la punción o de la abrasión a los músculos subyacentes (Garzón Bello, 2009).

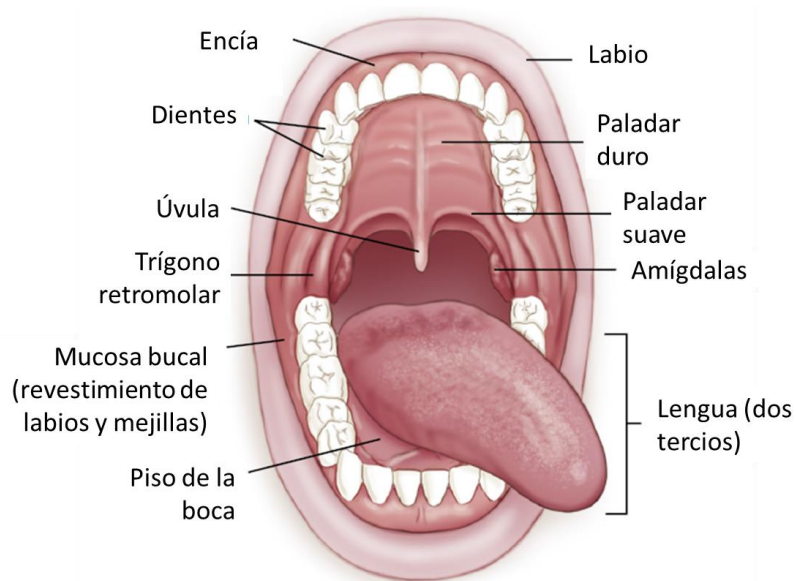


Figura 5. Anatomía de la boca. Adaptado de Fagin, Wax, & Petrisor (2018)

Se pueden encontrar tres tipos de mucosa en la cavidad oral: i) mucosa de revestimiento, ii) mucosa especializada, y iii) mucosa masticatoria. La mucosa del revestimiento se encuentra en el vestíbulo bucal externo (la mucosa bucal) y la región sublingual (suelo de la boca). La mucosa especializada se encuentra en la superficie dorsal de la lengua, mientras que la mucosa masticatoria se encuentra en el paladar duro (la superficie superior de la boca) y las encías. La mucosa del revestimiento comprende aproximadamente el 60%, la mucosa masticatoria aproximadamente el 25% y la mucosa especializada aproximadamente el 15% de la superficie total del revestimiento de la mucosa oral en un ser humano adulto (Gómes de Ferraris & Campos Muñoz, 2009).

La mucosa oral tiene un área superficial estimada de 100 cm^2 ($0,01 \text{ m}^2$), un pH local de 5,8-7,6, actividad enzimática moderada y una gran capacidad de absorción de drogas (V. F. Patel, Liu, & Brown, 2011).

El ambiente fisiológico principal de la cavidad oral, en términos de pH, volumen de fluido y composición, está formado por la secreción de saliva. La saliva es secretada por tres glándulas salivales principales (parótida, submaxilar y sublingual) y glándulas salivales o bucales menores situadas en la mucosa o inmediatamente debajo de ella. Las glándulas parótidas y submaxilares producen secreción acuosa, mientras que las glándulas sublinguales producen principalmente saliva viscosa con actividad enzimática limitada. Las funciones principales de la saliva son lubricar la cavidad oral, facilitar la deglución y prevenir la desmineralización de los dientes. También permite la digestión de carbohidratos y regula la flora microbiana oral mediante el mantenimiento del pH oral y la actividad enzimática. El volumen salival diario total está entre 0,5 y 2,0 litros. Sin

embargo, el volumen de saliva disponible constantemente es de alrededor de 1,1 ml, proporcionando así un volumen de fluido relativamente bajo disponible para la liberación del fármaco de los sistemas de administración bucal (V. F. Patel et al., 2011).

La saliva proporciona un entorno rico en agua de la cavidad oral que puede ser favorable para la liberación del fármaco de los sistemas de liberación, especialmente los basados en polímeros hidrófilos. Sin embargo, el flujo de saliva decide el intervalo de tiempo del fármaco liberado en el sitio de administración. Este flujo puede conducir a la ingestión del fármaco y es un concepto bien aceptado como "lavado de la saliva" (V. F. Patel et al., 2011).

El espesor de la mucosa oral varía dependiendo del sitio, al igual que la composición del epitelio. La mucosa de las zonas sujetas a estrés mecánico (la encía y el paladar duro) es queratinizada de manera similar a la epidermis. Sin embargo, la mucosa de las regiones del paladar blando, sublingual y bucal no está queratinizada. Los epitelios queratinizados contienen lípidos neutros como ceramidas y acilceramidas que se han asociado con la función de barrera. Estos epitelios son relativamente impermeables al agua. En contraste, epitelios no queratinizados, como el suelo de la boca y el epitelio bucal no contienen acilceramidas y sólo tienen pequeñas cantidades de ceramidas. También contienen pequeñas cantidades de lípidos neutros pero polares, principalmente colesterol sulfato y glucosil ceramidas. Se ha descubierto que estos epitelios son considerablemente más permeables al agua que los epitelios queratinizados.

Las células de los epitelios orales están rodeadas por moco, cuyos principales componentes son complejos de proteínas y carbohidratos; con un grosor de 40 a 300 μm . En la mucosa oral, el moco es secretado por las glándulas salivales mayores y menores como parte de la saliva. Aunque la mayor parte del moco es agua ($\approx 95\text{-}99\%$ en peso) los componentes macromoleculares claves son una clase de glicoproteína conocida como mucina (1-5 %), las cuales son moléculas grandes con masas moleculares que van desde 100 a 250 KDa y contienen grandes cantidades de carbohidratos (Gésime, Acevedo, & Lalaguna, 2009). Estas moléculas grandes son capaces de unirse para formar una red tridimensional extendida que actúa como un lubricante que permite a las células moverse entre sí, y también puede contribuir a la adhesión célula-célula. A pH fisiológico, la red de moco lleva una carga negativa debido a los residuos de ácido siálico y sulfato, formando una estructura de geles fuertemente cohesiva que se unirá a la superficie de las células epiteliales como una capa gelatinosa. Se cree que esta capa de gel juega un papel en la mucoadhesión para los sistemas de liberación de fármacos que trabajan sobre el principio de adhesión a la membrana mucosa y prolongan así el tiempo de retención de la forma de dosificación en el sitio de administración.

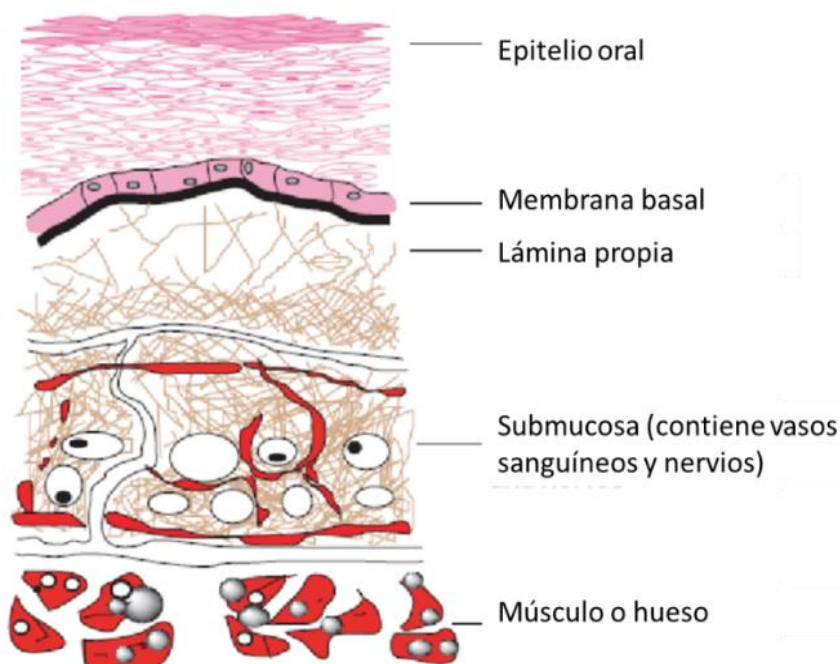


Figura 6. Estratos del epitelio de revestimiento de la cavidad oral. Adaptado de V. F. Patel et al., (2011)

Otro factor del epitelio bucal que puede afectar la mucoadhesión de los sistemas de administración de fármacos es el tiempo de rotación, que es el tiempo de recambio para el epitelio bucal, el cual se ha estimado entre 3 y 8 días en comparación con unos 30 días para la piel, lo cual puede cambiar las características de permeabilidad con frecuencia.

3.5 Afecciones de la mucosa oral

La caries dentales y las enfermedades periodontales son las enfermedades infecciosas más comunes que afectan a la humanidad (González Barrón et al., 2003). En la mayoría de los casos, los agentes causantes parecen ser miembros de la microbiota indígena y, por lo tanto, las infecciones pueden considerarse endógenas. La placa bacteriana o la biopelícula acumulada en la superficie de los dientes y compuesta de microbiota oral nativa es el principal agente etiológico de la enfermedad periodontal (Sarduy Bermúdez & González Díaz, 2016). Las biopelículas son muy difíciles de erradicar y son fuente de muchas infecciones recalcitrantes. Varios agentes antisépticos incluyendo clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, fluoruros y los derivados del fenol se han utilizado ampliamente en odontología para inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, estas sustancias tienen varios efectos adversos, como vómitos, diarrea y manchas en los dientes. Además, el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos es una causa creciente de preocupación.

El medioambiente oral es una reserva de estafilococos. Distintas patologías infecciosas se asocian a la presencia de *S. aureus*. De forma general, se sabe que algunas infecciones orales son causadas por *S. aureus*. Estas incluyen queilitis angular, algunas infecciones endodónticas, parotiditis y, más recientemente reconocida, una forma de mucositis oral en personas mayores, pacientes dependientes de nutrición parenteral, niños inmunocomprometidos y pacientes con enfermedades sistémicas como artritis reumatoide, diabetes mellitus y malignidades hematológicas (Iglesias Valera, Saderra Estellers, and García Arumí 2015).

La lesión de la mucosa oral constituye un sitio favorable para la colonización y proliferación de bacterias que pueden aprovechar la solución de continuidad de la mucosa como vehículo para alcanzar otras zonas de los tejidos orales y/o del organismo. Se cree que *S. aureus* tiene un papel en la etiología de la mucositis oral, aunque también hay controversia debido a la diversidad de la microbiota presente en el medioambiente oral. La mucositis oral es una patología que se caracteriza por inflamación y ulceración de la mucosa oral, la cual se ve hinchada, eritematosa y friable, resultando en dolor, malestar, disfagia y debilidad sistémica. Por lo general, se dan en personas que cursan tratamientos con quimioterápicos y radiación lo que genera una atrofia en el epitelio oral y déficit en la renovación (Pereira de Carvalho et al., 2011).

3.6 Resistencia a antibióticos

En las últimas décadas, la susceptibilidad de los gérmenes ha variado, de modo que los microorganismos que fueron susceptibles a los agentes antimicrobianos por décadas, han desarrollado resistencia a estas terapias. Entre los múltiples mecanismos que han motivado ese proceso, sobresale la evolución sufrida por las betalactamasas y las mutaciones experimentadas por las proteínas transportadoras de penicilinas (Morejón-García, 2010).

La situación actual con los productos antimicrobianos determina que las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de morbilidad a nivel mundial, en especial en países subdesarrollados. Los microorganismos Gram negativos y en particular los Gram positivos como *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, colman la complejidad de la situación infectológica mundial (Echeverri-Zárate, 2008; Morejón-García, 2010).

La resistencia a los antimicrobianos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Esto reduce la eficacia del tratamiento, por lo que los pacientes permanecen infectados por un período más largo, y se incrementa el riesgo de propagación de microorganismos resistentes a otras personas (OMS, 2015).

En el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) correspondiente al año 2014 sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los antimicrobianos se puso de manifiesto que, en el caso de los antibióticos, esta cuestión ha dejado de ser una posible preocupación futura para convertirse en

un problema real que afecta al ámbito extrahospitalario y a hospitales de todo el mundo, y complica en gran medida la capacidad para tratar infecciones comunes (OMS, 2015). Para el año 2018 esta situación no ha mejorado, los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos. La situación es preocupante, por lo que se ha generado un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos y se ha creado el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (por sus siglas en inglés, GLASS) (OMS, 2018).

Hoy, ya se encuentra muy extendida la resistencia a los fármacos de primera elección para el tratamiento de infecciones de gravedad causadas por *Staphylococcus aureus*, tanto en centros de salud como en la población general (OMS, 2018). Esta situación ha motivado la investigación de nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente como medicinales, y de los extractos de muchas especies vegetales que han demostrado experimentalmente una eficaz acción antimicrobiana.

3.7 Productos naturales en terapia medicinal y el problema de su estandarización

Los principios activos de origen vegetal son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. En la búsqueda de nuevas moléculas activas, el foco se encuentra puesto en los productos derivados del metabolismo secundario de las plantas, los cuales son los más importantes como principios activos. Éstos se clasifican, según su estructura química en heterósidos, polifenoles, terpenoides y alcaloides. Los polifenoles comprenden una serie de compuestos químicos que se clasifican en: ácidos fenólicos o fenoles, cumarinas, flavonoides, lignanos, taninos y quinonas.

Los que tienen mayor interés farmacológico pertenecen al grupo de los flavonoides, dentro del cual se pueden distinguir: flavonas, flavonoles, flavanonas y sus correspondientes heterósidos, así como también los antocianósidos.

Las plantas medicinales siempre se emplearon a través de las distintas generaciones, basadas en un conocimiento popular. La población, sobre todo en los sectores más vulnerables y en ámbitos rurales, recurre muy frecuentemente al uso de plantas consideradas popularmente medicinales para atender sus problemas de salud. El elevado costo de los medicamentos contribuye a fortalecer esta tendencia. Cuando faltan recursos económicos para adquirir una especialidad medicinal, las familias recurren frecuentemente a "las fórmulas y recetas del campo". Independientemente de su eficacia, se trata de costumbres muy arraigadas (PROSISA, 2005).

Muchos de estos productos son comercializados sin ningún control de calidad. En algunas localidades del norte argentino, es habitual que las personas que hacen la recolección en el campo realicen ventas en las calles peatonales o centros comerciales, de especies que dicen que son medicinales. Tales especies no han pasado previamente siquiera por una identificación botánica para asegurarse la identidad de la especie comercializada.

El conocimiento sobre las plantas medicinales favoreció el desarrollo de formas farmacéuticas que incluyen principios activos de origen vegetal para diferentes afecciones. El desarrollo de un producto farmacéutico con ingredientes de origen vegetal presenta diferentes dificultades, más allá de los aspectos tecnológicos y la formulación de los extractos en una forma de dosificación adecuada, como pueden ser: el abastecimiento de la materia prima, la estandarización y la preparación de los extractos (Rajani & Kanaki, 2008).

Los extractos vegetales son mezclas complejas de variadas sustancias químicas, lo que plantea un problema de estandarización y control de calidad, pero ese mismo hecho es responsable de impartirles la característica de ser terapéuticamente eficaces con la ventaja de efectos sinérgicos y aditivos de sus componentes, y al mismo tiempo de tener menos efectos secundarios. Por lo tanto, desarrollar estándares adecuados para los productos a base de hierbas es un gran desafío.

Los métodos de estandarización deben tomar en consideración todos los aspectos que contribuyen a la calidad de las hierbas medicinales, a saber: identidad correcta de la muestra, evaluación organoléptica, evaluación farmacológica, materia volátil, evaluación cuantitativa (valores de cenizas, valores extractivos), evaluación fitoquímica, prueba de la presencia de xenobióticos, pruebas de carga microbiana, pruebas de toxicidad y actividad biológica. De estos, el perfil fitoquímico es de especial importancia ya que tiene una relación directa con la actividad de las hierbas medicinales. Además, es necesario generar perfiles fitoquímicos y adoptar una estrategia de estandarización basada en marcadores para minimizar la variación de lote a lote, para mantener la calidad y garantizar la seguridad y eficacia (Folashade, Omoregie, & Ochogu, 2012).

Dado que se sabe que las hierbas medicinales contienen compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos, es importante determinar los principales y en lo posible cuantificarlos, debido a que esto influirá en la eficacia del producto (Rajani & Kanaki, 2008). Para ello se emplean pruebas químicas simples a fin de determinar la presencia de, por ejemplo, alcaloides totales, esteroides, terpenoides, fenoles totales, flavonoides, cumarinas, taninos y antraquinonas.

Diferentes factores, como por ejemplo: la altura del lugar respecto del nivel del mar, las condiciones de suelo (irrigación de agua, salinidad, entre otros), el clima del lugar donde crece la planta, pueden afectar directamente a la especie vegetal, y pueden provocar variaciones en la composición química (Folashade et al., 2012), influyendo sobre la expresión cuantitativa de ciertas

moléculas, mientras que en otro ambiente se expresan otras, lo que da lugar a diferentes quimiotipos de una misma especie vegetal.

Considerando este antecedente, es importante determinar el quimiotipo de la especie vegetal de trabajo, porque quimiotipos diferentes de una misma especie pueden tener diferentes propiedades terapéuticas y/o variaciones en su toxicidad.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el análisis de plantas y formulaciones a base de hierbas presenta varios problemas derivados de su naturaleza compleja y la variabilidad inherente de sus constituyentes. La reproducibilidad de la configuración total de los componentes de fármacos a base de hierbas es importante. Para cumplir con este requisito es esencial establecer los quimioperfiles de las muestras.

3.8 Plantas medicinales como alternativa a antibióticos

Como se expresó en la sección anterior, las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas, como flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. (Davicino et al., 2007). Durante los últimos años, se han informado propiedades antimicrobianas de una amplia gama de extractos de plantas y productos naturales aislados a partir de ellas, en intentos por descubrir nuevas clases de antibióticos, para resolver problemas tales como la aparición de efectos secundarios indeseables, infecciones previamente poco comunes (Alviano et al., 2008) y resistencia antimicrobiana.

Varios trabajos informan el uso en medicina popular de especies del género *Lippia* (Verbenaceae) y la demostración de la actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo*, así como su efecto sinérgico cuando se las combinan con antibióticos (Pérez Zamora, Torres, & Nuñez, 2018). De acuerdo con la Farmacopea Vegetal Caribeña (PROSISA, 2005), las especies del género *Lippia* spp. están consideradas como sustancias generalmente consideradas como seguras (por sus siglas en inglés, GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés, FDA).

3.8.1 Especies vegetales usadas en esta tesis

La familia Verbenaceae incluye 2600 especies agrupadas en 100 géneros con distribución pantropical. El número más importante de especies se localiza en América Latina, donde se encuentran en una amplia gama de ecosistemas. Esta familia incluye hierbas, arbustos y algunos árboles. Son un elemento importante en la flora de América del Sur (O'leary et al., 2012). Las plantas de esta familia son conocidas como especies aromáticas, para uso ornamental, o en medicina popular desde la antigüedad. La mayoría de sus propiedades se deben al aceite esencial. (Bandoni, 2003). Muchos representantes de la familia Verbenaceae tienen usos medicinales

estrechamente relacionados con infecciones bacterianas, ya que tienen propiedades antisépticas y pueden usarse para el tratamiento de fiebre, heridas, diarrea, bronquitis, sinusitis, tétanos. Además, los principales compuestos químicos presentes en estas plantas son reconocidos por su acción antimicrobiana (Pérez Zamora et al., 2018).

Muchas especies del género *Lippia* tienen reconocida actividad antimicrobiana y se emplean a menudo en medicina popular en la provincia del Chaco. Basados en estos antecedentes, dos especies en particular fueron seleccionadas para ser estudiadas con potencial aplicación como antimicrobiano, y se describen a continuación.

***Lippia turbinata* (Griseb)**

Sinonimias: *Lippia aprica* Phil., *Lippia disepala* Phil., *Lippia globiflora* (L'Hér.) Kuntze f. *glabriuscula*, *Lippia turbinata* Griseb. f. *angustifolia* (IBODA s.f.)

Nombres vulgares: poleo, manzanillo, té del país.

Es un arbusto que se encuentra en regiones templadas y cálidas, ampliamente distribuido en el centro y oeste de la Argentina. Es una de las especies que figura en los listados de vegetales presionados por la excesiva recolección. Por sus propiedades antimicrobianas fue incorporada como droga oficial en la quinta y sexta Farmacopea Nacional Argentina (Schroeder, López, & Sauer, 2005).

Sus hojas se emplean en infusiones debido a sus propiedades digestivas, diuréticas y estimulantes del sistema nervioso. Es una especie rica en aceites esenciales, la cual tiene una amplia difusión en la industria para la preparación de licores (Schroeder et al., 2005), para la elaboración de yerba mate saborizada con hierbas digestivas (por ejemplo, se la incluye en la yerba mate de la marca Cachamate®), para producir té y bebidas no alcohólicas (ejemplo de una marca de bebida comercializada en Argentina y de gran consumo popular, que contiene esta especie, es Terma®). En el caso de los té, estos son usados principalmente como digestivos, diuréticos, antiinflamatorios y laxantes, entre otros (Juliani et al., 2004).

***Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

Sinonimias: *Lantana alba* Mill., *Lippia citrata* Cham., *Lippia geminata* Kunth, *Lippia geminata* Kunth var. *microphylla*, *Lippia globiflora* (L'Hér.) Kuntze var. *geminata*, *Lippia globiflora* (L'Hér.) Kuntze var. *normalis*, *Lantana geminata* (Kunth) Spreng., *Camara alba* (Mill.) Kuntze, *Zappania geminata* (Kunth) Gibert (IBODA s.f.)

Nombres vulgares: erva-cidreira en Brasil (ANVISA, 2011), salvia morada en Argentina,

Es un arbusto perenne nativo de regiones tropicales y subtropicales del continente Americano. Es una especie no domesticada y debido a su gran contenido de aceite esencial, es considerada como una especie medicinal en medicina folklórica (Bottignon et al., 2011). Su aceite esencial tiene muchas aplicaciones, principalmente en la industria química, farmacéutica y cosmética (Bottignon et al., 2011).

Por ejemplo, en Brasil esta especie es utilizada en forma de compresas para combatir hemorroides. El macerado es empleado para uso local contra el dolor de diente, y en forma de baños como febrífugo. Una infusión alcohólica es recomendada para combatir resfriados y la raíz es usada en el norte de Brasil para combatir infecciones hepáticas (Dias Costa, Aguiar, & do Nascimento, 2004). Además, esta especie posee actividad analgésica, miorrelajante y anticonvulsivante, las cuales son atribuidas a la presencia de flavonoides (luteolina, apigenina y naringenina) y monoterpenos (carvona, β -mirceno, citral, limoneno y linalol), en varias proporciones en diferentes quimiotipos (Conde, Correa, Carmona, Contini, & Pereira, 2011).

Extractos obtenidos a partir de las hojas fueron utilizados para realizar estudios farmacológicos, los cuales confirmaron actividad analgésica, espasmolítica, antibacteriana y expectorante, sin observar ningún efecto tóxico (Dias Costa et al., 2004).

Además, se ha encontrado que extractos vegetales acuosos, alcohólicos y acetónicos presentan actividad antitumoral en diferentes líneas celulares (Dias Costa et al., 2004).

Por otro lado, es una de las 66 especies vegetales que en Brasil se encuentran reguladas para propósitos medicinales (Conde et al., 2011). Indicaciones para preparar una infusión de esta especie se encuentra en una monografía del Formulario de Fitoterápicos de la Farmacopea Brasileira (ANVISA, 2011). En la misma se indica, modo de uso y posología de acuerdo a la edad, permitiendo su consumo a partir de los 3 años de edad. En esta Farmacopea, también se encuentran monografías con la elaboración de tintura (antiinflamatorio y antiséptico de la cavidad oral), gel y jabón (antiséptico, antimicrobiano, escabicida), incluyendo el extracto de otra especie, la *Lippia* (*L. sidoides*).

Extractos de esta especie han demostrado ser seguros para consumo humano (DL_{50} ¹ 460mg/Kg). Por otro lado, el extracto etanólico obtenido por maceración en etanol 70° (2 % p/v) demostró que es capaz de reducir tanto la frecuencia como la intensidad de migrañas en humanos sin producir efectos secundarios (Conde et al., 2011).

¹ DL_{50} es definida como la cantidad de droga que mata el 50 % de los individuos en estudio.

3.9 Dificultad tecnológica para vehiculizar extractos vegetales

Si bien las plantas y sus extractos constituyen una alternativa terapéutica, incorporar un extracto vegetal en una formulación farmacéutica presenta diversos inconvenientes. Se debe tener en cuenta la naturaleza del extracto vegetal y el tipo de forma farmacéutica en la que se pretende incluirlo. Una desventaja en el desarrollo de productos fitoterápicos es que la mayoría de los medicamentos a base de hierbas poseen carácter hidrofóbico (Ansari, Islam, & Sameem, 2012). Además, los extractos vegetales suelen presentar problemas de fluidez y de compresibilidad (A. J. R. Rodríguez, Pérez, Lafoucade, Escalona, & Iraizoz, 2014).

Para intentar resolver estas desventajas, varios polifenoles han sido formulados en diferentes sistemas de liberación de fármacos entre los que se destacan: ciclodextrinas, emulsiones, geles, micropartículas, nanocápsulas lipídicas, nanoemulsiones y liposomas. Estos sistemas permiten estabilizar el producto, aumentar su solubilidad y mejorar su biodisponibilidad (Mignet, Seguin, & Chabot, 2013).

Muchos compuestos activos de tipo polifenol son sensibles al calor y la luz. Una formulación del tipo emulsión puede requerir calentamiento y esto afectaría a la integridad del extracto. En el caso de las formulaciones del tipo gel puede ser un desafío el intentar incluir el extracto si no son solubles en agua.

3.10 Formas farmacéuticas de aplicación tópica

Las formas farmacéuticas de aplicación tópica pueden ser sólidas (polvos dérmicos, parches, películas tipo apósitos), líquidas (lociones y linimentos) y semisólidas (pomadas, cremas, pastas, geles y emulgeles) (Lozano et al., 2012).

El desarrollo de esta tesis se enfocó en formulaciones semisólidas, especialmente en geles y emulgeles, y en formulaciones sólidas del tipo películas.

3.10.1 Geles

La Farmacopea Argentina en su última edición define a los geles como sistemas semisólidos con un alto contenido acuoso o hidroalcohólico y baja o media viscosidad conferida por un agente gelificante. Además, estos sistemas semisólidos se caracterizan por una estructura continua que le confiere propiedades de sólidos. Un gel polar típico consta de un polímero y un líquido hidrofílico. Los polímeros pueden ser de origen natural, semisintético o sintético. En el caso de los de origen natural los más utilizados suelen ser: las gomas tragacanto, las pectinas, el agar y el alginato de sodio. Dentro de los materiales semisintéticos, los más empleados son los derivados de la celulosa, como la hidroxipropilcelulosa (HPC), la hidroximetilcelulosa (HMC), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y la carboximetilcelulosa (CMC). Por último, dentro de los

sintéticos, los más conocidos son los derivados del ácido poliacrílico, conocidos comúnmente como carbómeros o carbopoles (Lozano et al., 2012)

3.10.1.1 Descripción de los polímeros usados

Carbopoles

Carbopol® es la marca comercial de una serie de polímeros cuya estructura está compuesta por moléculas ácidas secas y en espiral fuerte. Una vez dispersadas en agua, las moléculas comienzan a hidratarse y desenrollarse parcialmente. La forma más común de conseguir el espesamiento máximo de los polímeros de Carbopol® es convirtiéndolo en una sal. Esto se logra fácilmente neutralizando el polímero con una base fuerte común como hidróxido de sodio (NaOH) o una base débil como la trietanolamina (TEA) (Monografías Farmacéuticas, 2002; Rowe, Sheskey, & Owen, 2006). Al neutralizar el polímero los grupos ácidos de la cadena se ionizan, quedan cargados negativamente, lo que provoca la repulsión de los grupos ácidos de la cadena y en consecuencia ésta se desenrolla y la solución que contiene se torna viscosa.

Gelificantes derivados de celulosa

La celulosa es un polímero lineal insoluble de unidades repetidas de glucosa en un anillo o forma piranosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. Cada unidad repetida de glucosa (excepto las 2 terminales) contiene un grupo OH primario en el carbono 6 y 2 secundarios en los carbonos 2 y 3; el primario es el más reactivo. La modificación química de la celulosa se debe a reacciones o a sustituciones de los grupos oxidrilos. El alcance de esas reacciones se expresa como grado de sustitución (GS), o sea, el número de grupos oxidrilo sustituido por residuo de glucosa. El valor más alto es GS=3. Los valores fraccionarios son la regla, debido a que el GS se promedia sobre una multitud de residuos de glucosa. Los derivados más utilizados son la metilcelulosa (MC), la CMC, la HPC y la HPMC (Garzón, Tecante, Ramírez-Gilly, & Palacios, 2009; Rowe et al., 2006; Tapia Villanueva & Sapag-Hagar, 1995).

Metilcelulosa: existen varios grados de polimerización y sustitución de la MC, lo que define las propiedades físicas como la solubilidad. Se la emplea en la elaboración de geles en concentraciones del 1 al 5 %, pero también tiene muchos otros usos en farmacia.

Carboximetilcelulosa de sodio: en geles se usa del 3 al 6 %, a concentraciones menores se suele usar como agente emulsificante en inyecciones, en soluciones orales o en recubrimiento de comprimidos. En el mercado existen distintos tipos de CMC, las cuales se diferencian en el grado de sustitución de los grupos OH, lo que define su solubilidad y comportamiento. Se las clasifica generalmente como CMC de baja, media o alta viscosidad de acuerdo a su peso molecular.

3. Marco teórico

Hidroxipropilmetilcelulosa: sustituido con grupos metoxi, grupos éter de propilenglicol y grupos hidroxipropilo. Estos últimos reducen algo su solubilidad en agua y favorecen la solubilidad en solventes orgánicos polares como los alcoholes de cadena corta, glicoles y algunos éteres

Aunque los hidrogeles hechos de polímeros naturales pueden no proveer suficientes propiedades mecánicas y pueden contener patógenos o generar una respuesta inmune/inflamatoria, pueden ofrecer muchas otras propiedades ventajosas como ser: biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Sepigel® 305

Sepigel® 305 es una dispersión en isoparafina de una solución acuosa de poliacrilamida y Laureth-7 (Dong, Liu, Cun, & Fang, 2015), empleado en la elaboración de cosméticos, tiene afinidad tanto por sustancias hidrofílicas como oleofílicas, actúa como un viscosante y estabilizante de las formulaciones. Fue el primer polímero líquido multifuncional producido por polimerización inversa. Se encuentra pre-neutralizado y es efectivo en un amplio rango de pH. Es un excelente estabilizador y agente texturizante.

Pemulen™

Los emulsionantes poliméricos Pemulen™ son predominantemente polímeros de ácido poliacrílico de alto peso molecular. Estos nuevos emulsionantes primarios tienen una pequeña porción lipofílica además de una gran porción hidrofílica (Ajazuddin et al., 2013).

Esta estructura química permite que funcionen como emulsionantes primarios en emulsiones de aceite en agua. Mientras que los polímeros solubles en agua de Carbopol® han demostrado ser útiles como estabilizadores de emulsión de aceite en agua (o/w) secundarios, los polímeros de Pemulen™ pueden formar emulsiones de aceite en agua. Pemulen™ TR-1 NF puede emulsionar hasta un 20 – 30 % de aceite por peso, mientras que Pemulen™ TR-2 NF puede emulsionar hasta un 50 % de aceite por peso. La porción lipofílica se adsorbe en la interfase aceite-agua y la porción hidrófila se hincha en el agua formando una red de gel alrededor de gotitas de aceite para proporcionar una estabilidad excepcional de la emulsión a una amplia gama de aceites (Pino & Martínez, 2014).

Los tensioactivos iónicos o no iónicos convencionales requieren concentraciones entre el 3 y 7 % de tensioactivo para estabilizar emulsiones de aceite en agua, haciéndolo principalmente por adsorción y formación de capas cristalinas líquidas laminares en la interfaz de la emulsión. El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de la fase oleosa y el tensioactivo deben ser cuidadosamente ajustados para asegurar una buena estabilidad de la emulsión. A menudo se añaden hidrocoloides poliméricos para aumentar la estabilidad de las emulsiones de aceite en agua por espesamiento y adición de valor de rendimiento o estructura a la fase acuosa.

Al formar emulsiones de aceite en agua, las moléculas de Pemulen™ forman una capa de gel adsorbida alrededor de cada gotita de aceite, con las porciones hidrófobas del polímero ancladas en la fase oleosa. Por lo tanto, cuando dos gotas de aceite se aproximan entre sí, se genera una fuerza repulsiva física por la presencia de estas capas de gel adsorbidas. Esto se logra con concentraciones muy bajas de Pemulen™ y la formulación resulta altamente estable.

Ambos tipos permiten la formulación de emulsiones permanentes a niveles muy bajos de uso del polímero (menos del 0,3 % del peso), incluso a temperaturas elevadas, sin usar surfactantes con propiedades irritantes. Las emulsiones a base de polímeros Permulen® depositan una capa oclusiva sobre la piel, proporcionando medicamentos tópicos en forma de lociones y cremas de baja irritación que dejan una sensación superior en la piel. También pueden usarse para formular geles tópicos de alta claridad con componentes iónicos.

Al igual que Carbopol®, Pemulen™ debe neutralizarse (pH de 6,5 - 7,5) para lograr la máxima viscosidad (Pino & Martínez, 2014).

Polytrap®

Polytrap® 6603 consiste en partículas unitarias de polimetileno de metacrilato de laurilo/dimetacrilato de glicol, de menos de un micrón, que se asocian en aglomerados de 20-80 micrones (Waysbort et al., 2009). Estos aglomerados se agrupan electrostáticamente en macropartículas de 200-1200 micras de tamaño. Debido a que estos agregados están débilmente asociados, Polytrap® 6603 se rompe al frotar sobre la piel transportando una sensación lubricante y permitiendo que las partículas "desaparezcan" sobre la piel.

Es capaz de absorber el exceso de oleosidad de la piel; se usa para conseguir la liberación controlada de activos líquidos, también como controlador de la grasitud. Encapsula líquidos, los convierte en polvo y libera durante su aplicación. Su nombre INCI es Lauryl Methacrylate/Ethylene Glycol Dimethacrylate Crosspolymer. Habitualmente se emplea en el rango de 0,5-4%. Proporciona control de sebo en todos los tipos de formulaciones incluyendo lociones, geles, emulsiones o/w y w/o. También se utiliza en el cuidado de la piel, incluyendo productos antienvjecimiento, cuidado del acné, cremas hidratantes y máscaras faciales, cosméticos de color incluyendo polvos sueltos y prensados, polvos corporales y maquillajes líquidos, fragancias, artículos de tocador incluyendo desodorantes, lociones corporales, protectores solares (Waysbort et al., 2009).

3.10.2 Emulgeles

Un emulgel surge de la combinación de un gel con una emulsión convencional al agregar un agente gelificante en la fase acuosa de una emulsión de signo aceite en agua (Panwar et al., 2011). Una de las principales desventajas que presentan los hidrogeles es la dificultad de

vehiculizar sustancias hidrofóbicas. Por esta razón, los emulgeles pueden ser una interesante alternativa al poder solubilizar fármacos hidrofóbicos en la fase oleosa de la emulsión convencional. Además, los emulgeles se caracterizan por ser fácilmente extensibles, emolientes, poco grasos, y de apariencia transparente y agradable (Ajazuddin et al., 2013).

3.10.2.1 Descripción de sustancias empleadas en la fase oleosa de las emulsiones estudiadas

A continuación se describen las características de las sustancias empleadas como fase oleosa en las emulsiones, de acuerdo a Monografías Farmacéuticas (2002):

Ceral PW

Es una cera autoemulsionable no iónica, apropiada para la fabricación de cremas, lociones y emulsiones (tipo aceite en agua). Es compatible con todos los tipos iónicos, como por ejemplo, agentes de estructura catiónica (acrilavina, efedrina, antihistamínicos, etc), antibióticos o sales de metales polivalentes como Al, Zn, Sr, Ca, Mg, etc.; y compuestos cuaternarios, usados como antisépticos. Se emplean concentraciones de 5%-23 % (Monografías Farmacéuticas, 2002).

Ceral 10

Es un material básico recomendado especialmente para la formulación de leches, cremas y pomadas de aplicación farmacéutica, de gran blancura y notable resistencia a las variaciones de temperatura. Es compatible con las grasas y aceites vegetales, animales y minerales, agua oxigenada, vitaminas, etc. y los productos de aplicación común en las formulaciones cosméticas. Solo está contraindicado su empleo conjunto con productos catiónicos.

Alcohol cetílico

Es una mezcla de alcoholes alifáticos sólidos, principalmente constituida por hexadecanol. Se lo emplea como emoliente, absorbente de agua, espesante y emulsificante de tipo secundario, así como también estabilizante de emulsiones. En cremas y pomadas, evita la evaporación de agua de la piel.

Alcohol estearílico

Es una mezcla de alcoholes alifáticos con no menos del 95 % de octadecanol. Posee propiedades emulsificantes débiles y emolientes. Se lo emplea en cremas y pomadas, tiene la capacidad de incorporar agua.

Alcohol cetoestearílico

Es una mezcla de alcoholes alifáticos que contiene no menos del 40 % de alcohol estearílico y la suma del contenido de alcohol cetílico y alcohol estearílico no debe ser menor al 90 %. Es una base no autoemulsionable, usada como agente de consistencia y en combinación con emulgentes de tipo O/W para la preparación de emulsiones de fase externa acuosa de carácter neutro. Viscosante de emulsiones, para cremas y ungüentos.

Ácido oleico

Se lo emplea como coadyuvante de emulsiones, con álcalis forma agentes emulsionantes. Favorece la penetración transdérmica de principios activos.

3.10.2.2 Descripción de tensioactivos empleados

Se describen las características de acuerdo a Monografías Farmacéuticas (2002):

Span 60 (estearato de sorbitano)

Es una mezcla obtenida por esterificación parcial del ácido esteárico con sorbitol y sus mono- y dianhídridos. Sólido céreo amarillo pálido. Insoluble en agua fría, dispersable en agua caliente. Tensioactivo no iónico, empleado en la elaboración de emulsiones y pomadas en concentraciones de 1-15 %.

Polisorbato 80 (Tween 80)

Se trata de una mezcla de ésteres parciales del ácido oleico con sorbitol, y sus anhídridos. Líquido oleoso, transparente, amarillento o amarillo parduzco, con olor característico suave. Miscible con agua y alcohol. Puede darse cambio de color o precipitaciones con sustancias como fenoles, taninos, alquitranes y derivados. Emulgentes del tipo surfactante no iónico. Origina emulsiones de fase externa acuosa, estable y de textura fina, que se afecta poco por altas concentraciones de electrolitos o cambios de pH.

3.11 Formas de administración en la cavidad bucal

Dentro de las formas de administración para ser aplicadas en la cavidad bucal encontramos, formas líquidas como las lociones, y formas sólidas, como por ejemplo: caramelos, parches, películas o comprimidos. La elección de la forma farmacéutica ideal dependerá de los objetivos planteados y de la afección a tratar. Cada una posee sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, las formulaciones líquidas son comúnmente empleadas para una acción tópica local como las irritaciones o llagas, de manera que el principio activo pueda ejercer su efecto rápidamente; pero,

3. Marco teórico

por otro lado, presentan la desventaja de ser lavadas rápidamente por la saliva, por lo que su tiempo de permanencia en el sitio de acción es limitado (Preis, 2014). En el caso de los parches bucales, estos se emplean para administrar principios activos que necesitan entrar rápidamente en circulación sistémica al aprovechar la absorción en la cavidad bucal, la cual permite además que los fármacos no sean metabolizados por el hígado (Krampe et al., 2015). Con este mismo fin se suelen emplear los comprimidos sublinguales o las películas sublinguales, que por lo general contienen fármacos que requieren ser absorbidos inmediatamente.

Las películas son sistemas de liberación que consisten en una lámina de polímero delgada y flexible, la cual puede desintegrarse rápidamente (o no) en una cantidad determinada de agua. Fueron desarrolladas en el año 1970 como una alternativa a los comprimidos o cápsulas orales. Consisten en una tira muy fina que se coloca sobre la lengua o mejillas internas y, después de ser hidratado, libera el fármaco dentro de la cavidad oral (Preis, 2014).

En los últimos años, varios principios activos han sido utilizados en el desarrollo de películas orales de aplicación sublingual con el objetivo de lograr una rápida disolución y absorción para ejercer un efecto sistémico (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de películas orales comercializadas con fines medicinales

Nombre	Laboratorio	Principio activo	Indicación	Año de aprobación
Listerine® Pocket Pacs/Breath Strips	Warner-Lambert (Pfizer, Johnson y Johnson)	Aceite esencial	Refrescante	2000
Sudafed® PE quick dissolve strips	Pfizer (Johnson y Johnson)	Fenilefrina	Alergia	2005
Risperidone HEXAL® SF	HEXAL	Risperidona	Esquizofrenia	2010
Niquitin®	GlaxoSmithKline	Nicotina	Síntomas de abstinencia de nicotina	2012

Por otro lado, resulta interesante la posibilidad de contar con un producto de acción local en la mucosa oral, que no se lave fácilmente con la saliva y que se adhiera para poder permanecer

mayor tiempo en el sitio de acción. Por estas razones, el desarrollo de películas bucales resulta una interesante alternativa.

Las películas para aplicación en la cavidad bucal deben presentar algunas características particulares como ser: delgadas (con rangos de espesor entre 1 y 10 mm y un área superficial entre 1 y 20 cm²), estar además disponibles en varios tamaños y formas, poseer baja adherencia en seco para permitir su fácil manejo y aplicación, buena capacidad mucoadhesiva y, rápida velocidad de hidratación para facilitar un rápido ablandamiento y liberación del principio activo (la velocidad de liberación dependerá del objetivo medicinal).

Este tipo de formulaciones requiere de los siguientes componentes (Krampe et al., 2015):

- ✓ Principio activo
- ✓ Polímero formador de la película (generalmente hidrosoluble)
- ✓ Plastificante
- ✓ Saborizante o edulcorante
- ✓ Colorante (opcional)

Existen distintos métodos para la elaboración de las películas, entre los que se destacan: i) *solvent casting*, ii) *semi-solid casting*, iii) *hot melt castin*, iv) *Rolling method* y v) *solid dispersión extrusión*. De los mencionados anteriormente, el método más utilizado en los trabajos científicos es el conocido como *solvent casting* o método de evaporación del solvente (descrito en metodología, sección 4.10 Preparación y selección de las películas)

3.12 Sistemas mucoadhesivos

Un sistema mucoadhesivo es una forma farmacéutica con capacidad de adherirse a la membrana mucosa de algunos órganos, o a la capa de mucina que presentan las membranas mucosas (I. C. Rodríguez, Cerezo, & Salem, 2000).

La utilización de sistemas mucoadhesivos es esencial para mantener un contacto íntimo y prolongado de la formulación con la mucosa (V. F. Patel et al., 2011).

Las formas farmacéuticas bioadhesivas generalmente se aplican en seco, con el polímero en forma no hidratada, y al ir absorbiendo agua del lugar de fijación se produce la plastificación del hidrogel. En estas condiciones de hidratación se efectúa la adhesión a las superficies biológicas (I. C. Rodríguez et al., 2000).

3.13 Teoría sobre la mucoadhesión

El grupo de macromoléculas mucoadhesivas más ampliamente estudiado e investigado en sistemas de administración de fármacos bucales son aquellas macromoléculas hidrofílicas que contienen numerosos grupos formadores de enlaces de hidrógeno.

La presencia de grupos hidroxilo, carboxilo o amina en las moléculas favorece la adhesión. Se llaman adhesivos "húmedos" ya que son activados por humectación y se adhieren de forma no específica a muchas superficies. A menos que la absorción de agua esté restringida, pueden sobrehidratarse para formar un mucílago resbaladizo.

Para los sistemas secos se han identificado dos pasos básicos en la mucoadhesión. El primer paso es la "etapa de contacto" donde se establece un contacto íntimo entre la membrana mucoadhesiva y la mucosa. Dentro de la cavidad bucal, la formulación puede usualmente ponerse en contacto con la mucosa requerida y mantenerse en su sitio para permitir la adhesión. El segundo paso es la etapa de "consolidación" en la que se producen diversas interacciones físico-químicas para consolidar y reforzar la unión adhesiva, llevando a una adhesión prolongada. La interacción entre el polímero y la capa de mucina es el resultado de fuerzas de atracción y repulsión. Las interacciones atractivas provienen de las fuerzas de Van der Waals, atracción electrostática, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. Las interacciones repulsivas ocurren por la repulsión electrostática y estérica (V. F. Patel et al., 2011; I. C. Rodríguez et al., 2000).

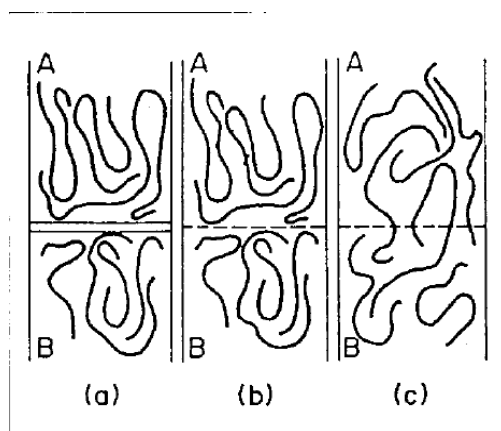


Figura 7. Modelo interpretativo de la interpenetración molecular del polímero bioadhesivo (A) con las proteínas de mucus (B). (a), (b) y (c) representan los sucesivos estadios de acercamiento, contacto superficial e interpenetración polímero mucoadhesivo/proteínas del mucus. Imagen extraída de Rodríguez, Cerezo, and Salem (2000).

3.14 Polímeros para sistemas mucoadhesivos

Los atributos poliméricos que son pertinentes a altos niveles de retención en sitios aplicados y dirigidos a través de enlaces mucoadhesivos incluyen hidrofiliidad, potencial de carga negativo y la presencia de grupos formadores de enlaces de hidrógeno. Adicionalmente, la energía libre superficial del polímero debe ser adecuada para que se pueda lograr "humedecer" con la superficie de la mucosa. El polímero también debe poseer suficiente flexibilidad para penetrar en la red de moco, ser biocompatible y no tóxico (V. F. Patel et al., 2011).

Los polímeros mucoadhesivos pueden ser aniónicos, catiónicos y no iónicos, pero son los aniónicos quienes presentan mayor mucoadhesión (Peh & Wong, 1999).

Los polímeros aniónicos son los más empleados en las formulaciones farmacéuticas debido a su alta funcionalidad mucoadhesiva y baja toxicidad (V. F. Patel et al., 2011). Poseen grupos funcionales carboxilo y sulfato que dan lugar a una carga negativa global neta a valores de pH que superan el pKa del polímero. Ejemplos de este tipo de polímero son ácidos poliacrílicos y sus derivados débilmente reticulados, carboximetilcelulosa sódica (Na CMC). Estos forman fuertes enlaces de hidrógeno con la mucina (Fefelova, Nurkeeva, Mun, & Khutoryanskiy, 2007; Karki et al., 2016). Entre los sistemas poliméricos catiónicos, indudablemente el quitosano es el más ampliamente investigado dentro de la literatura científica actual.

Los polímeros nuevos son menos susceptibles a las tasas de rotación de moco, con algunas especies adhesivas directamente a las superficies de la mucosa; más precisamente denominados "citoadhesivos". Ejemplos de este tipo lo constituyen los polímeros tiolados, derivados de polímeros hidrofílicos tales como poliacrilatos, quitosano o goma gellan desacetilada. La presencia de grupos tiol permite la formación de enlaces covalentes con sub-dominios ricos en cisteína de la capa de gel de moco que conduce a un mayor tiempo de residencia. Esto los hace menos susceptibles a cambios en el pH o la fuerza iónica (Karki et al., 2016; Rayo & Guerrero, 2014).

3.15 Evaluación de formas farmacéuticas

Los controles a realizar se definen de acuerdo a la forma farmacéutica. Los mismos están orientados principalmente a garantizar la calidad de los productos y suelen detallarse en las monografías que se encuentran en las distintas Farmacopeas, las cuales proporcionan una orientación actualizada sobre los requisitos a cumplir.

La apariencia de cualquier forma farmacéutica es importante para la aceptación por parte del paciente, por lo que es importante evaluarla así como sus caracteres organolépticos. El producto final debe presentar en general características agradables y ser estable en el tiempo. En el caso de

los productos de aplicación tópica además de lo mencionado anteriormente, el valor de pH de la formulación no debe superar un pH de 7.

En nuestro caso, para los geles se decidió estudiar los siguientes parámetros: caracteres organolépticos (color, olor, apariencia general), homogeneidad, textura, extensibilidad, viscosidad, pH, conductividad, concentración de principio activo, límite microbiano, actividad antibacteriana, tamaño de partícula si se corresponde y pérdida de peso en el envase.

Para el caso de las películas, las propiedades alcalinas o ácidas de la superficie pueden conducir a un microentorno ácido o alcalino en la interfaz de la película y la mucosa, pudiendo causar irritación y daño de la mucosa. El dolor resultante y el riesgo de infección conducirían a una reducción significativa de la aceptación y mal cumplimiento del paciente. Teniendo en cuenta esto, las películas deberían tener un valor de pH que ronde un valor neutral para no producir irritación en las mucosas de la cavidad bucal (Krampe et al., 2015).

Las películas bucales son una forma farmacéutica relativamente nueva, la Farmacopea Argentina no contiene una definición de la forma farmacéutica “película oral”, ni los ensayos de control de calidad que se deben aplicar. En la Farmacopea Europea se incluyeron las películas orales como una forma farmacéutica a partir del 2012, actualizando la monografía sobre “preparaciones orodispersables” en la cual fueron incluidas las películas dentro del capítulo de “preparaciones mucoadhesivas”, donde también se agregó el capítulo “películas orodispersables” (Preis, 2014).

En cuanto a los ensayos de control de calidad que deben realizarse a las películas, la Farmacopea Europea establece que se debe realizar el *test* de disolución y que deben presentar una cierta resistencia mecánica, pero no ofrece técnicas estandarizadas de caracterización y evaluación. En artículos científicos publicados algunas de las pruebas realizadas son: determinación de pH, *folding endurance* o resistencia al doblamiento, resistencia a la tracción, mucoadhesividad, liberación, disolución e índice de humectación entre otros (Avachat, Gujar, & Wagh, 2013; Chantasart, Tocanitchart, Wongrakpanich, Teeranachaideekul, & Junyaprasert, 2017; V. F. Patel et al., 2011; Peh & Wong, 1999).

Los métodos estandarizados para evaluar resistencia mecánica de las películas están destinados a materiales como papel y plásticos. Pero no hay una técnica estándar para evaluar películas medicinales, por lo tanto no hay un criterio para conocer cuál es la resistencia mecánica adecuada para estos productos.

Resistencia mecánica de películas

La resistencia mecánica de las películas se determina mediante tres parámetros (fuerza de tensión, elongación hasta la rotura y módulo de Young) evaluados en el ensayo conocido como “ensayo de

tracción". En el mismo se someten las películas a un estiramiento desde sus extremos hasta que se rompen. El equipo empleado para este estudio se conecta a una computadora con un *software* en donde se configuran las condiciones del ensayo. Durante la realización del mismo se registra un gráfico del esfuerzo realizado en función de la deformación de la película.

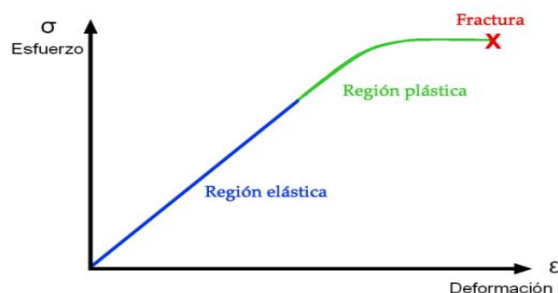


Figura 8. Modelo de gráfico de la relación esfuerzo-deformación que se puede obtener en este tipo de ensayos. Imagen extraída de Rivas Cruz (2015).

De este ensayo se determina la **resistencia a la tracción o fuerza de tensión (RT)**, la cual da información sobre el máximo esfuerzo que las películas pueden soportar antes de romperse. Da idea sobre su fragilidad al momento de manipular y con qué facilidad pueden llegar a romperse. Para ello, el espesor promedio de la tira de película se aplica en el cálculo del área de la sección transversal de la muestra. La resistencia a la tracción se calcula dividiendo la carga máxima (N) por el área de la sección transversal (mm²):

Ecuación 1

$$RT = \frac{\text{Carga máxima (N)}}{\text{Espesor (mm)} \times \text{ancho (mm)}}$$

La **elongación hasta la rotura (ER)** da información sobre el alargamiento que ha sufrido la película antes de romperse, se expresa como un porcentaje respecto de la longitud inicial. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2

$$ER \% = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

En donde L_0 es la longitud inicial de la película antes de estirarse y L es la longitud alcanzada inmediatamente antes de romperse.

El **Módulo Elástico o Módulo de Young** es el resultado de dividir la tensión por la deformación unitaria, dentro de la región elástica (porción recta en la curva ascendente) de un diagrama

esfuerzo-deformación. Indica la rigidez de un material, cuanto mayor es el valor del módulo de Young, más rígido es el material.

El estudio de la resistencia mecánica de las películas permite determinar la fragilidad o resistencia que pueden presentar durante la manipulación. Esta resistencia es un factor crucial durante la producción o el desarrollo y también en relación con el manejo por parte del paciente (Preis, 2014).

Liberación de principios activos

Cuando la formulación a estudiar contienen un polímero en su matriz, la liberación del principio activo puede producirse por distintos mecanismos, simple difusión del principio activo de un lugar de mayor concentración a otro de menor concentración, por disolución del polímero y posterior difusión, por difusión a través de poros o canales que forma el polímero, o una mezcla de ellos.

El mecanismo de liberación de principios activos desde un hidrogel fue estudiado por muchos autores quienes han desarrollado modelos matemáticos que permiten explicarlos. Esto resulta útil para caracterizar y comparar diferentes perfiles de liberación, lo cual se logra mediante el ajuste de los datos experimentales de un perfil de liberación a los modelos matemáticos. Los distintos modelos relacionan la liberación del fármaco con el tiempo a través de una ecuación exponencial. Estos modelos, se ajustan principalmente al 60-70 % de la cantidad de fármaco liberada, debido al efecto *burst* (liberación inicial rápida), relacionado con una difusión de las moléculas de principio activo localizadas en la superficie de las muestras (Colpo da Silva, 2017).

A continuación se describen los modelos analizados en esta tesis y la interpretación de los parámetros de cada ecuación.

Ecuación 3, modelo de Higuchi

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = kt^{1/2}$$

Ecuación 4, modelo de Kormeyer-Pepas

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = kt^n$$

Ecuación 5, modelo de Peppas-Sahlin

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k_1t^n + k_2t^{2n}$$

En las distintas ecuaciones, t es el tiempo de liberación, M_t es la cantidad de fármaco liberada en el tiempo t ; M_∞ es la cantidad total de fármaco liberada o la que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t); k en el modelo de Higuchi es una constante de velocidad de liberación, en los otros modelos es una constante cinética que depende de las características estructurales y geométricas de la matriz polimérica.

En el modelo de Korsmeyer- Peppas, k_1 e k_2 son constantes y el primer término ($k_1 t^n$) representa la contribución del mecanismo de difusión de Fick, y el segundo término ($k_2 t^{2n}$) representa la contribución del relajamiento de las cadenas poliméricas (Colpo da Silva, 2017).

En los distintos modelos n es el exponente difusional, y su valor es un indicador del mecanismo de liberación, en general se interpreta de la siguiente manera (Martínez, 2016):

- Valores cercanos a 0,5 (0,43-0,5, según geometría de la matriz) indican que la liberación es por difusión de Fick. En este caso, el estudio se puede continuar aplicando el modelo de Higuchi (liberación proporcional a la raíz cuadrada del tiempo).
- Valores cercanos a 1 (0,85-1, según geometría de la matriz) indican que la liberación está controlada por procesos de relajación de las cadenas del polímero, lo que se denomina transporte “Caso II”. Estos perfiles presentan una liberación constante en el tiempo que se ajusta al modelo cinético de orden cero cuya liberación es independiente de la cantidad de fármaco remanente.
- Valores comprendidos entre los dos anteriores (variables según geometría) indican que en la liberación influye tanto la difusión como la relajación de las cadenas poliméricas, y se denomina “Transporte anómalo”. En este caso, se puede estudiar el perfil de liberación empleando el modelo cinético de orden uno o mediante el modelo aditivo de Peppas-Sahlin, que indica la contribución de cada proceso al mecanismo global de liberación.
- Valores superiores a 1 (0,85-1, según geometría de la matriz) aparecen generalmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados, denominándose “Transporte Super Caso II”.
- Cuando n toma valores inferiores a 0,5 (o 0,45, según geometría de la matriz) puede concluirse que el mecanismo de liberación es por difusión de Fick o difusión casi fickiana posiblemente debida a una combinación de mecanismos de difusión a través de la matriz hinchada y difusión a través de poros llenos de agua.

3.16 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad se realizan para determinar el período de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales el producto mantiene ciertos parámetros en un rango determinado.

3. Marco teórico

La estabilidad de una sustancia o producto puede verse afectada por las condiciones de almacenamiento (luz, temperatura, humedad, aire) así como por su interacción con el envase.

Estos estudios deben orientarse para la región donde serán destinados, considerando la zona climática estipulada. El mundo se halla dividido en cuatro zonas climáticas. La Argentina se encuentra en la Zona II, que se define como subtropical con posible humedad elevada, donde la temperatura promedio es 25 °C y la humedad relativa (HR) es del 60 % (ANMAT, 2002).

La FA 7° edición (2007) establece que las condiciones para estudio de estabilidad a largo plazo requieren de 25 °C \pm 2 °C y una HR del 60 % \pm 5 % por un tiempo mínimo de 12 meses, mientras que las condiciones de estabilidad acelerada implican una temperatura de 40 °C \pm 2 °C y una HR de 75 %, con un tiempo mínimo de 6 meses.

Las condiciones de humedad relativa dependerán de la forma farmacéutica que se evalúe, para formulaciones deshidratadas puede ser importante el contenido de humedad ambiente, pero en formas con alto contenido de agua no tanto, pero siempre debe aplicarse el mismo intervalo de temperatura (FA 7, 2007).

La evaluación de la estabilidad debe cubrir características físicas, químicas, biológicas y microbiológicas, incluyendo propiedades particulares de los productos.

Los parámetros a monitorear variarán según la formulación y se decidirán a partir de la información obtenida del estudio de preformulación y formulación.

Los ensayos deben cubrir todos los atributos que pueden modificarse durante el almacenamiento.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Obtención, caracterización y evaluación de actividades biológicas de las especies vegetales

4.1 Recolección del material vegetal

Las especies *Lippia alba* y *L. turbinata* fueron recolectadas en noviembre del 2013 y marzo del 2014, en su ambiente natural, en campos del departamento 25 de Mayo de la provincia del Chaco, Argentina. Sus coordenadas son longitud 60° 6'26" W latitud 26° 53'30" S para *L. turbinata* y, longitud 60° 4'45" W latitud 26° 54'6" S para *L. alba*.

La identificación taxonómica la realizó el Profesor Farm. Alberto Bela, en el laboratorio de Farmacobotánica de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus).

Un ejemplar herborizado de cada especie fue depositado en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) con el siguiente número de registro: CTES0059998 para *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson y CTES0059999 para *Lippia turbinata* Griseb.

Una vez cosechadas las plantas, se las lavó para quitar la tierra e insectos que pudieran tener, luego se las dejó secar a temperatura ambiente (27 ± 3 °C) y a la sombra durante 7 días. El material seco se conservó en bolsas plásticas bien cerradas hasta la operación de molienda.



Figura 9. Plantas de *L. turbinata* en el campo, con algunas inflorescencias marchitas (A) y otras recién florecidas (B).



Figura 10. Plantas de *L. alba* en su ambiente silvestre (A), y en el laboratorio luego de ser recolectadas (B y C).



Figura 11. Hojas de *L. alba* secándose sobre la mesada del laboratorio de Tecnología Farmacéutica (UNCAus).

4.2 Obtención de los extractos vegetales

4.2.1 Aceite esencial

Para la caracterización de las especies vegetales en estudio se buscó conocer el quimiotipo de las mismas, mediante el análisis de sus aceites esenciales (AE). Para ello, luego de la recolección y lavado del material vegetal, se lo oreó durante 48 horas al abrigo de la luz en un espacio libre de humedad, con circulación de aire mediante ventilador.

La obtención de los aceites se realizó en dos etapas.

Etapas 1: de cada especie se separaron las hojas y flores de los tallos, y esos primeros materiales fueron sometidos a destilación por arrastre de vapor, empleando un dispositivo (Figura 12) diseñado por el Prof. Alberto Bela en la UNCAus. En este proceso se obtiene un agua aromática (AA) que contiene el AE.

Etapas 2: los AE se extrajeron por el método de cohobación a partir del AA obtenida, mediante el uso de un equipo tipo Clavenger (Figura 13).

Ambos aceites esenciales fueron recolectados en recipientes de vidrio color caramelo y se añadió sulfato de calcio para retirar el agua que no pudo ser eliminada en el proceso.



Figura 12. Equipo empleado en la etapa 1 del proceso de obtención de los aceites esenciales.

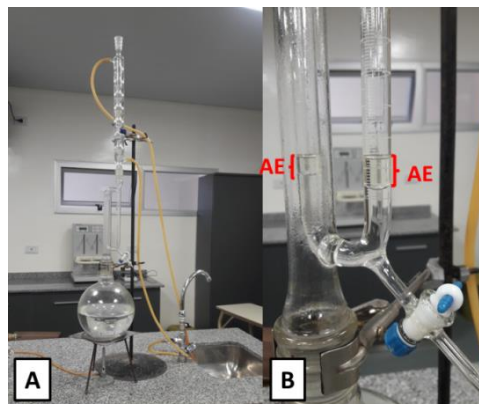


Figura 13. A) Equipo empleado en la etapa 2 del proceso de extracción de AE. B) Detalle de la zona de separación del AA y de AE.

4.2.2 Extracto hidroalcohólico

Las hojas secas de cada especie en estudio fueron reducidas a polvo moderadamente fino empleando un molinillo de cuchillas y se ajustó el tamaño de partículas con tamices de malla N° 20 y 45, según la escala ASTM (*American Society for Testing and Materials*).

Se procedió a la obtención de los extractos fluidos de acuerdo a lo establecido por Farmacopea Nacional Argentina (1978) empleando el polvo de hojas que ha pasado el tamiz de malla N° 20 pero no pasó el tamiz de malla N° 45, y etanol 70° como solvente. Para ello se usaron lixiviadores de vidrio color verde como se muestra en la Figura 14. Dicho dispositivo es de diseño propio a partir de botellas de vidrio.

Los extractos fluidos fueron almacenados en botellas de vidrio color verde, con tapón de corcho a 8 °C hasta su uso.



Figura 14. Lixiviadores montados, empleado para obtener los extractos hidroalcohólicos.

4.3 Caracterización del material vegetal

4.3.1 Determinación del quimiotipo de las especies vegetales

Las especies del género *Lippia* presentan quimiotipos que varían de acuerdo a las condiciones del medio ambiente donde crece la planta.

La presencia o ausencia de determinados compuestos químicos en las plantas aportan fundamentalmente las características terapéuticas y sus posibles usos. Conocer el quimiotipo con el cual se trabaja es importante, debido a que la composición puede cambiar de un quimiotipo a otro en la misma especie vegetal, modificando las propiedades terapéuticas de la planta o su toxicidad.

El AE obtenido se envió al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, de la Universidad Nacional De Córdoba, donde se realizó la identificación de los compuestos y la determinación del porcentaje relativo de estos en los AE mediante cromatografía gaseosa.

Se empleó un cromatógrafo gaseoso GC/MS Clarus 600, Perkin Elmer N° de serie 664N9100105. Los datos fueron adquiridos empleando el programa TurboMass 5.4.2. Las condiciones de corrida fueron: columna DB5 (60 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm de partícula), marca Perkin Elmer; gas *carrier*: helio (49.6 psi); inyector: 250 °C. Programa del horno de la columna: temperatura inicial 60 °C durante 5 min, Rampa: 5°C/min hasta 240 °C. Temperatura final: 240 °C durante 10 min. La muestra se inyectó en modo Split. El cromatograma fue obtenido en modo "scan", desde $m/z=40$ a $m/z=350$ (*scan time*: 0,2 s, *inter-scan time*: 0,1 s). *Solvent delay*: 5 min.

Las muestras de AE fueron diluidas en hexano en una proporción de 1/100 para *L. turbinata* y 1/50 para *L. alba*.

La identificación de los picos se realizó por comparación con los espectros de las bibliotecas del programa NIST MS Search 2.0. Los componentes en concentraciones menores a 2 % no se identificaron.

4.3.2. Identificación de compuestos no volátiles en las especies vegetales

En una primera aproximación a la composición química, se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar del extracto fluido. Luego se determinó el contenido de compuestos fenólicos según la técnica de Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, (1999) empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Además, los extractos se caracterizaron teniendo en cuenta los siguientes aspectos: color, olor, pH, densidad y solubilidad en distintos solventes y del rendimiento de extracto seco por cada 100 ml de extracto fluido.

4.3.2.1. Screening fitoquímico

La distintas reacciones de identificación no se aplicaron al extracto hidroalcohólico directamente porque la intensa coloración de éstos interfirieron en los colores observados.

Las determinaciones se realizaron a distintas fracciones que se obtuvieron a partir de los extractos hidroalcohólicos. El proceso de fraccionamiento de los extractos se esquematiza en la Figura 15.

En el *screening* se siguió el procedimiento para el fraccionamiento de los extractos y el reconocimiento de cada grupo de metabolitos secundarios de acuerdo a Rondina & Coussio (1989).

A continuación se describen las reacciones de identificación:

FRACCIÓN A: sobre esta fracción se investigaron flavonoides, taninos, lípidos e hidratos de carbono.

***Flavonoides:** *reacción de Shinoda:*

Se llevó a sequedad 0,5 ml de la fracción A y se retomó con igual volumen de agua destilada. Luego se agregó unas granas de Zn y 0,2 ml de HCl concentrado. Se observó la aparición de color. Posteriormente se agregaron 0,2 ml de alcohol amílico, se diluyó con 2 ml de agua destilada y se observó el color en la fase orgánica. Se dejó transcurrir una hora y observó el color.

El resultado es positivo si da coloración púrpura (varía del rosa muy tenue al color guinda) que pasa a la fase orgánica.

***Taninos y OH fenólicos**

Reacción del $FeCl_3$:

Se llevó a sequedad 3 ml de fracción A. Se disolvió el residuo en 1 ml de agua destilada y se agregaron 3 gotas de $FeCl_3$ acuoso al 1%.

Resultados: 1 OH: color amarillo; 2 OH adyacentes: verde grisáceo; 3 OH adyacentes: azul negro.

Reacción con gelatina:

Se secaron 3 ml de fracción A, luego se redisolvió en 1 ml de agua destilada. Se añadieron 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 0,5%.

Un resultado positivo se manifiesta por turbidez y hasta la observación de precipitado.

***Lípidos**

4. Metodología experimental

Se sembró unas gotas de la fracción A en papel de filtro, se dejó secar y se expuso el papel a vapores de yodo.

Un resultado positivo se manifiesta por la aparición de color marrón-anaranjado.

***Hidratos de carbono**

Se secaron 2 ml de la fracción A, se redisolvió en agua y se le adicionó 0,5 ml de una solución acuosa de fenol al 5 %, luego se le agregó en la superficie gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Un resultado positivo se manifiesta por coloración anaranjada o parda.

FRACCIÓN B (CLOROFÓRMICA): sobre esta fracción se analizaron: esteroides y triterpenos, y antraquinonas.

***Esteroides y triterpenos:** *reacción de Lieberman-Buchard*

Se mezclaron 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se adicionó 2 ml de la fracción B y se continuó enfriando en el baño de hielo. Se agregó (por las paredes) una gota de ácido sulfúrico concentrado, previamente enfriado. Se continuó enfriando y luego de unos minutos se observó la coloración.

Coloración verde azulada indica la presencia de un grupo esteroide. Coloración rojo naranja evidencia un grupo triterpénico.

***Antraquinonas:** *reacción de Bonträger*

Se agitó suavemente 3 ml de la Fracción B con 5 ml NaOH 5 % y se observó el color.

Un resultado es positivo cuando la fase acuosa se torna roja o amarilla con fluorescencia roja.

FRACCIÓN C: sobre esta fracción se investiga alcaloides, cardenólidos, esteroides y leucoantocianinas.

***Alcaloides:** *reacción de Dragendorff*

Para la reacción se tomó 0,2 ml de la fracción C, se llevó a sequedad, se retomó con 2 ml de HCl 1% y se le agregaron 2 gotas del reactivo de Dragendorff.

El resultado es positivo si se forma un precipitado pardo anaranjado.

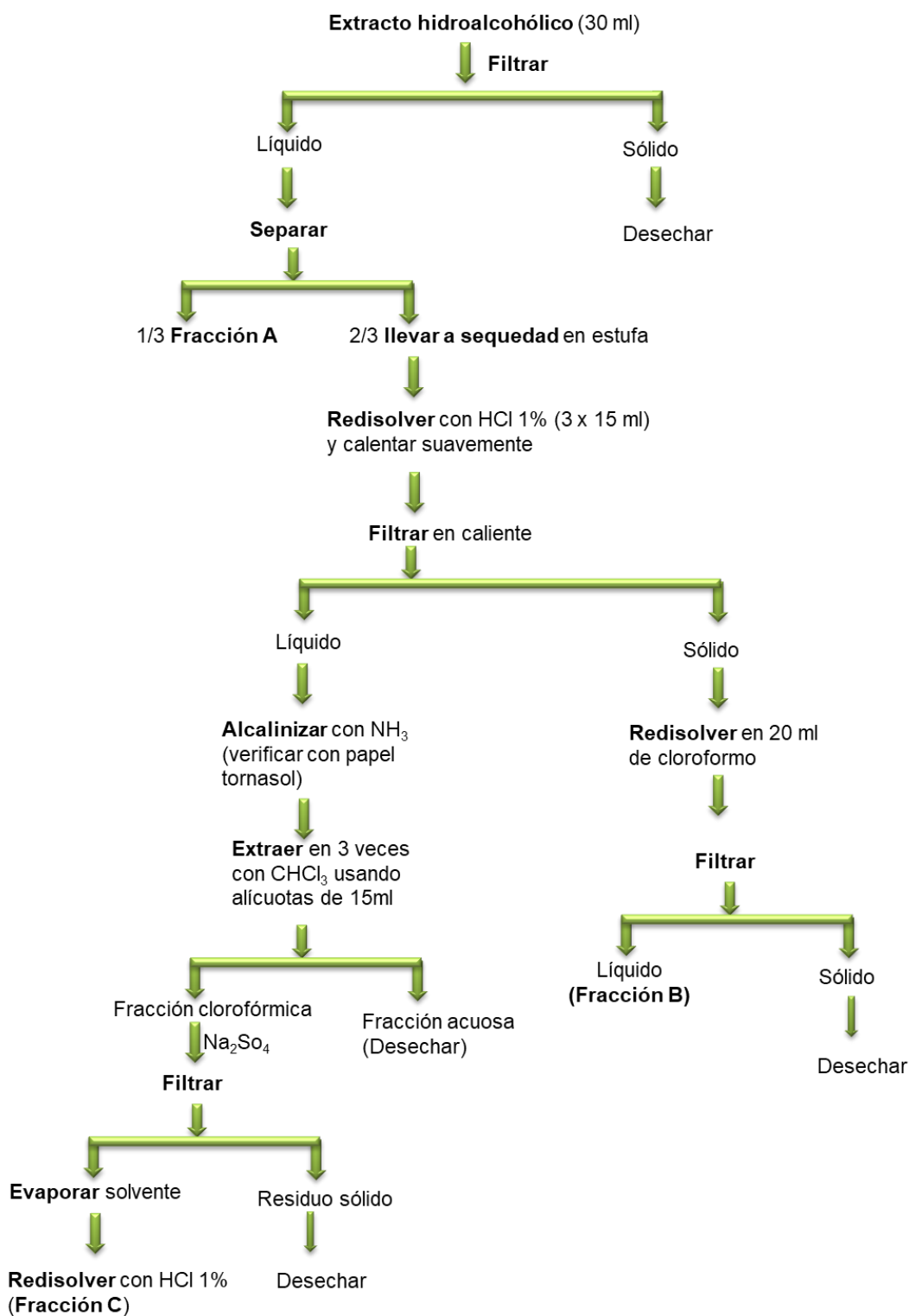


Figura 15. Esquema de la marcha fitoquímica para la detección de metabolitos secundarios.

4. Metodología experimental

***Cardenólidos** (lactonas pentagonales con una insaturación)

Se ensayó sobre papel de filtro. A una gota de fracción C (llevada previamente a sequedad y retomada con etanol), se le agregó 0,1 ml del reactivo de Mayer.

El resultado será positivo si presenta coloración violeta o púrpura persistente.

***Esteroides:** se procede como se describió para la fracción B.

***Leucoantocianinas:** reacción de Rosenheim

Se llevó a sequedad 2 ml de fracción C y se redisolvió en el mismo volumen de HCl 1% en agua. Se le agregó 1 ml de HCl concentrado, se mezcló y se calentó a baño María (BM) durante 10 minutos. Se enfrió, se le agregó un pequeño volumen de alcohol amílico y se agitó suavemente. Observar el color del alcohol amílico.

Un resultado positivo presenta una coloración carmesí hasta rosa pálido.

Reacciones Directas

***Saponinas**

Se calentó a BM 0,5 g de droga seca y pulverizada, con 8 ml de agua destilada durante 30 minutos. Se filtró en caliente y se colocó 1 ml de esta solución en un tubo de hemólisis. Se tapó con el dedo y se agitó fuertemente durante 15 segundos. Se midió la altura de la espuma producida a los 5 y 15 minutos (poder espumígeno de las saponinas).

***Glicósidos cianogenéticos:** reacción de Guignard

Se prepara previamente papel picrosódico, para eso se embebió el papel en picrato sódico (preparado con carbonato de sodio al 5 % y ácido pícrico al 0,5 % en agua) y se lo secó en estufa.

Se colocó 0,5 g de la droga pulverizada en un tubo grande. Se humectó con cantidad suficiente de agua, se agregó una gota de cloroformo (para que favorezca la reacción enzimática). Se colocó un trozo de papel picrosódico suspendido, sin que toque los bordes del tubo y se le colocó el tapón. Se calienta en estufa a 35 °C y se observó el color desarrollado.

Este ensayo debe dejarse al menos 24 horas antes de informar resultado negativo.

El resultado es positivo si el papel de filtro se torna rojo.

***Antraquinonas y derivados:**

Se colocó 0,8 g del polvo vegetal en un tubo de ensayo, se agregó 10 ml de NaOH 2% y se calentó a BM durante 20 minutos, agitando con una varilla. Se enfrió el tubo, se filtró y analizó de la siguiente forma:

1- Una parte del filtrado se acidificó con HCl concentrado hasta pH ácido (se comprobó con papel tornasol). Se agregó 2 ml de benceno y se agitó suavemente. Se separó la fase orgánica y se agregó 0,5 ml de solución de NaOH 5%. Se observó el color en la fase acuosa y comparó con lo descripto para la fracción B - antraquinonas. Resultado positivo: se observa color rojo.

2- A otra alícuota del filtrado se le agregó unas gotas de ácido nítrico fumante, y a continuación se añadió unas gotas de amoníaco dejándolas mezclarse gradualmente con el líquido ácido, hasta aparición de color violeta.

3- Otra alícuota de filtrado se calentó en presencia de HCl y FeCl_3 . Luego se agitó la solución con benceno. La fase orgánica se separó en otro tubo y a la acuosa se le adicionó 0,5 ml de solución NaOH 5%. Se observa la aparición de color rojo en la fase acuosa alcalina.

****Proteínas y aminogrupos: reacción de la Ninhidrina***

A 1 g de hojas molidas se le agregó 50 ml de agua, se calentó a ebullición durante 2 minutos. El líquido se filtró en caliente y el filtrado se evaporó hasta 5 ml. Sobre papel de filtro se colocó 1 gota de la solución anterior y se dejó secar. Se agregó una gota de solución de Ninhidrina 0,2 % en etanol. Se hizo en paralelo un blanco de reactivo y un testigo utilizando triptófano en etanol al 50%. Se llevó a estufa a temperatura entre 110-120 °C.

El resultado es positivo si se observa una mancha azul violeta de igual, menor o mayor intensidad que el testigo, y deberá ser de mayor intensidad que el blanco del reactivo.

4.3.2.2 Determinación del contenido de polifenoles totales

Este es un método colorimétrico que permite la detección de compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (polifenoles, ácido tánico, taninos, ácido clorogénico, etc.). Para esta determinación se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual es una mezcla de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico. A partir de esta mezcla se producen iones de molibdato y tungsteno, de color amarillo cuando se encuentra oxidado pero se colorea azul cuando es reducido por sustancias con capacidad antioxidante. En particular, los compuestos fenólicos generan, en medio básico, el ión fenolato que reduce al reactivo de Folin-Ciocalteu, dando lugar a la formación de un complejo de molibdeno (V), coloreando la solución de azul, cuya absorbancia es medida en un espectrofotómetro a 760 nm (Muñoz-Bernal et al., 2017).

4. Metodología experimental

Se realizó una curva de calibración usando ácido gálico. Partiendo de una solución madre cuya concentración fue 10 mg/ml, se prepararon diluciones seriadas hasta 0,001 mg/ml. Para construir la curva se tomó 100 µl de cada solución, a la cual se le adicionó 1900 µl de agua destilada, 200 µl de una dilución acuosa (una parte del reactivo y 4 partes de agua destilada) del reactivo de Folin-Ciocalteu y 800 µl de una solución acuosa de carbonato de sodio 16 % (p/v). Se dejó reaccionar durante 30 minutos y luego se midió la absorbancia. Finalmente, se graficaron los microgramos de ácido gálico/100 µl de cada solución *versus* la absorbancia, se calculó la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación lineal R^2 .

Cada extracto hidroalcohólico y la mezcla de ellos fue diluida (100 µl de extracto en 900 µl de etanol 70°). De esta dilución se tomaron 50 µl, se le adicionó 1950 µl de agua destilada y las mismas cantidades de solución de reactivo de Folin-Ciocalteu y solución de carbonato que se mencionaron anteriormente. Luego de 30 minutos de reacción, se midió la absorbancia.

El contenido de fenoles totales en el extracto se calculó aplicando la ecuación lineal de la curva de calibración, la cual se multiplica por la fracción formada entre el factor de dilución de los extractos (dilución 1/10, factor 10) y el volumen en mililitros del extracto empleado en la reacción (50 µl = 0,05 ml), como se muestra en la ecuación 6. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (µg EAG/ml).

Ecuación 6:

$$\text{Contenido fenólico } \mu\text{g} \frac{\text{EAG}}{\text{ml extracto}} = (27,345 * \text{Abs} - 0,1455) * \frac{10}{0,05}$$

Las mediciones se realizaron por triplicado para cada dilución de extracto. Los resultados se expresaron como el promedio de las tres mediciones y su desviación estándar.

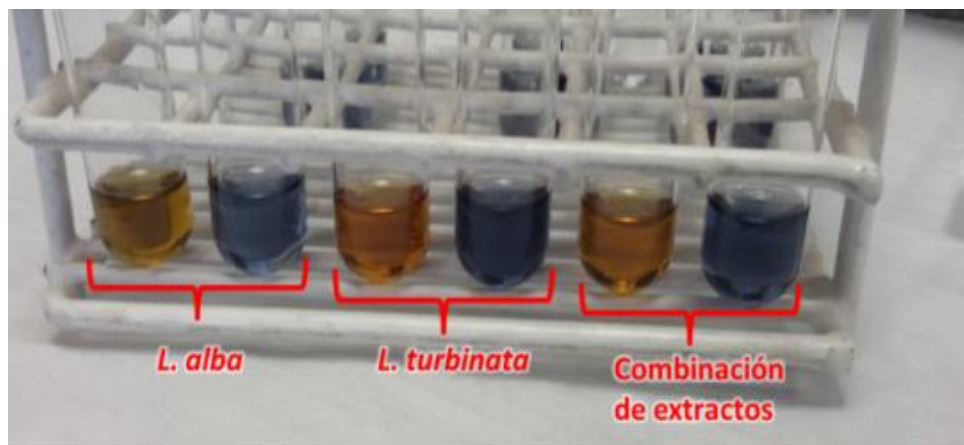


Figura 16. Tubos con diluciones del extracto de *L. alba*, de *L. turbinata*, y la combinación de ellos y, junto a cada uno, los tubos donde ha reaccionado con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

4.3.3 Determinación del rendimiento de los extractos

Un mililitro de cada extracto fue colocado en un tubo eppendorf y sometido a 105 °C en estufa hasta peso constante. El cálculo se realizó por la diferencia entre los pesos de los tubos eppendorf con extracto y los pesos de los respectivos tubos vacíos, para determinar el residuo sólido que queda por mililitro de extracto, luego se multiplicó por 100 para expresarlo como rendimiento porcentual (% p/v) del extracto.

La determinación se realizó por triplicado, el resultado se expresa como el promedio y la desviación estándar.

4.3.4 Determinación del pH

Se realizó por inmersión directa del peachímetro (HANNA® HI 9811-5) en el extracto fluido. La medición se realizó en tres alícuotas de cada extracto. El resultado se presenta como el promedio y la desviación estándar de sus valores.

4.3.5 Determinación de la densidad

Se determinó usando un picnómetro de 10 mililitros a 21 °C, para lo cual se registró el peso del picnómetro vacío y luego de cargarlo con 1 ml de extracto, y se calculó la diferencia entre ambos pesos. La densidad se expresa como los gramos que contiene cada mililitro de extracto.

4.4 Determinación del poder antimicrobiano de los extractos

Se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos combinados empleando la técnica del tablero de ajedrez (Moody, 2007). Para ello, primero se determinó la concentración inhibitoria mínima de cada extracto siguiendo el procedimiento descrito en el documento M07-A9 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (por sus siglas en inglés, CLSI) para bacterias y M27-A3 para levaduras (CLSI, 2012; CLSI, 2008).

Preparación de los extractos

De cada extracto vegetal, se prepararon diluciones seriadas dobles en dimetilsulfóxido (DMSO), a partir de los extractos secos (previamente evaporados a 40 °C hasta peso constante). Para definir las concentraciones de ensayo, se tuvo en cuenta el contenido de compuestos fenólicos. Se realizaron los cálculos necesarios de modo que la concentración a ensayar esté contenida en 3 µl de solución del extracto. La concentración de las diluciones estuvo comprendida entre 1000 y 62,5 µg EAG/ml.

Microorganismos de ensayo

Para el estudio de la actividad antimicrobiana se emplearon cepas pertenecientes a la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las bacterias Gram positivas empleadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Enterococcus faecalis* 29212. Las bacterias Gram negativas empleadas fueron *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas de levaduras empleadas corresponden a distintas especies de cándidas, como se nombran a continuación: *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y aislamientos clínicos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.

4.4.1. Técnica de microdilución en caldo

Se trabajó de acuerdo a la técnica de microdilución en caldo propuesta por el CLSI (CLSI, 2012; CLSI, 2008), empleando microplacas de 96 pocillos, de plástico, estériles, con fondo en U. Las oquedades en las microplacas se encuentran enumeradas del 1 al 12 (columnas) y nombradas con letras en orden alfabético (filas), desde la A a la H.

Las cepas se conservan refrigeradas a -20 °C en medio de cultivo caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) con 20 % de glicerina. Al momento de usarlas, deben encontrarse en la etapa de crecimiento exponencial, para ello, las bacterias se activaron cultivando una muestra en Caldo Müeller Hinton (MH) durante 24 horas a 37 °C. Este cultivo se repicó en otro tubo con el mismo medio de cultivo, se dejó crecer durante 12 horas, se repicó nuevamente en otro tubo y este último, con 8 horas de crecimiento, es el que se empleó en el ensayo. Las cepas de Cándidas se activaron en Caldo Sabouraud durante 24 h a 37 °C, luego se realizó una siembra en Agar Sabouraud y se dejó incubar 48 h a 37 °C. Con un ansa se picó sobre algunas colonias de Cándidas para suspenderla en solución fisiológica estéril para la preparación del inóculo.

El inóculo del ensayo debe poseer una turbidez que coincida con la del estándar de turbidez McFarland 0.5. Esto se logró midiendo en espectrofotómetro ($\lambda=625$ nm para bacterias y $\lambda=530$ nm para *Cándidas*) la absorbancia de una suspensión de una cierta cantidad de medio de cultivo inoculado en solución fisiológica. La absorbancia de esta suspensión debe estar en el rango de 0,08 - 0,10.

Del inóculo bacteriano ajustado se agregaron 50 μ l a un tubo con 5 ml de caldo MH ajustado en cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Cada pocillo se cargó con 3 μ l de cada dilución de extracto, antibiótico o solvente; luego se agregó 100 μ l de caldo de cultivo inoculado con la suspensión de bacteria. El pocillo posee un volumen final de 103 μ l.

Del inóculo de *Cándidas* ajustado, se realizó una dilución 1:100 en solución fisiológica estéril, a partir de la cual se vuelve a diluir en el medio de cultivo del ensayo (caldo Sauboraud), en una

relación 1:20 (concentración final del inóculo 10^3 ufc/ml). Luego, 100 μ l de esta suspensión se cargan en cada oquedad que contiene los 3 μ l de extractos.

Una fila de la placa se dispone para realizar un control de inhibición empleando diluciones seriadas de un antibiótico de referencia, apropiado para los microorganismos ensayados. Otra línea se dispone para realizar un control de crecimiento positivo, en ausencia de inhibidores y un pocillo es cargado sólo con medio de cultivo para realizar un control de esterilidad. También un control fue cargado sólo con el solvente de los extractos, para descartar que la inhibición se deba a un efecto del solvente. Las placas se cubren con papel film y se dejan incubar durante 24 horas a 37 °C.

Se considera que hay crecimiento cuando se puede observar la presencia de un botón blanco en el fondo de cada oquedad. El control de crecimiento cargado solo con solvente debe mostrar una gran turbidez. La placa del control del inóculo debe mostrar buen crecimiento y estar libre de organismos contaminantes. El control de esterilidad debe estar libre de cualquier crecimiento.

Se define como concentración inhibitoria mínima (CIM) a la menor concentración de sustancia que inhibe el crecimiento del microorganismo ensayado.

En caso de dudas debido a la formación de precipitado en el medio, se pueden agregar unas gotas de solución de sal de tetrazolio para confirmar el valor de CIM. Las células metabólicamente activas transforman en pocos minutos a la sal de tetrazolio (amarilla) en azul de formazán, coloreando el medio de azul. En este caso, el valor de CIM será el correspondiente a la menor concentración de extractos donde el medio no se colorea de azul.

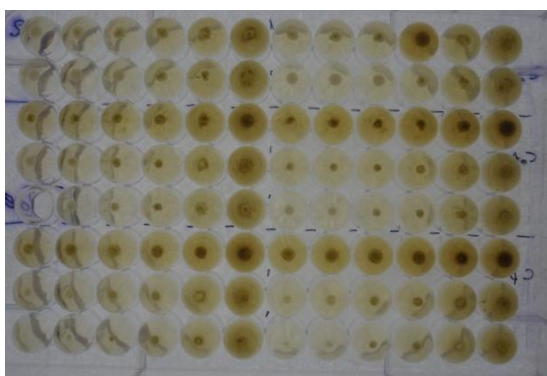


Figura 17. Policubeta de 96 pocillos con fondo en U, vista desde abajo, 24 horas después de ser incubada.

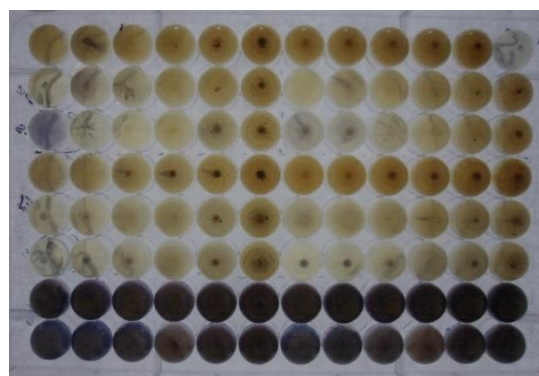


Figura 18. Policubeta de 96 pocillos con fondo en U, vista desde abajo, después de ser incubada y revelada con solución de sal de tetrazolio.

4.4.2 Técnica del tablero de ajedrez

Es un método de susceptibilidad para evaluar la actividad inhibidora o bactericida de concentraciones específicas en combinación de 2 o más componentes, en dilución en caldo, en un tiempo fijo. Las interacciones *in vitro* se calculan algebraicamente y se interpretan como sinérgicas, indiferentes o antagónicas dependiendo de si la actividad antibacteriana de la combinación es mayor, igual o menor que, respectivamente, las actividades de los agentes individuales.

Tabla 2. Esquema de la combinación de los extractos.

		Concentración de <i>L. turbinata</i> (µg EAG/ml)							
		500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90
Concentración de <i>L. alba</i> (µg EAG/ml)	500	500/500	500/250	500/125	500/62,5	500/31,25	500/15,62	500/7,81	500/3,90
	250	250/500	250/250	250/125	250/62,5	250/31,25	250/15,62	250/7,81	250/3,90
	125	125/500	125/250	125/125	125/62,5	125/31,25	125/15,62	125/7,81	125/3,90
	62,5	62,5/500	62,5/250	62,5/125	62,5/62,5	62,5/31,25	62,5/15,62	62,5/7,81	62,5/3,90
	31,25	31,25/500	31,25/250	31,25/125	31,25/62,5	31,25/31,25	31,25/15,62	31,25/7,81	31,25/3,90
	15,62	15,62/500	15,62/250	15,62/125	15,62/62,5	15,62/31,25	15,62/15,62	15,62/7,81	15,62/3,90
	7,81	7,81/500	7,81/250	7,81/125	7,81/62,5	7,81/31,25	7,81/15,62	7,81/7,81	7,81/3,90
	3,90	3,90/500	3,90/250	3,90/125	3,90/62,5	3,90/31,25	3,90/15,62	3,90/7,81	3,90/3,90

A partir de los valores de CIM, se prepararon diluciones seriadas dobles de cada extracto, cuyas concentraciones fueron inferiores a 1000 µg EAG/ml, y se combinaron como indica la Tabla 2. Luego se procedió como se indica para la técnica de microdilución en caldo.

4.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los extractos

La lipooxigenasa es una enzima que está involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria por la generación de mediadores proinflamatorios conocidos como leucotrienos o mediadores antiinflamatorios conocidos como lipoxinas (Rosalina & Dekker, 2014) a partir de ácidos grasos insaturados que contienen estructuras de dieno 1-4.

La actividad inhibitoria de la lipooxigenasa se puede determinar por espectrofotometría a 234 nm basado en la reacción de oxidación del ácido linoleico cuyo producto de reacción son los hidroperóxidos (Akula & Odhav, 2008).

Las reacciones enzimáticas se realizaron en ausencia y en presencia de inhibidores.

Los extractos se llevaron a sequedad y fueron redissueltos en etanol 70°, para preparar soluciones de concentraciones conocidas expresadas como peso en volumen (µg/ml).

Se empleó Indometacina (I.M. 75[®] Montpellier Indometacina) en buffer pH =9 como antiinflamatorio de referencia (Jiménez-Aspee et al., 2015; Mohan et al., 2013) a una concentración de 150 µg/ml.

Preparación de la solución de Indometacina: se partió del polvo contenido en ampollas para preparar inyectables, se diluyó de acuerdo a lo indicado en el prospecto, de esta solución se tomaron 60 µl y se llevó a 10 ml con buffer pH = 9.

Preparación de la solución de buffer pH 9: se disolvió 12,4 g de H₃BO₃ y 14,41 g de KCl en 400 ml de agua destilada y se llevó a pH 9 por el agregado una solución de NaOH (0,2 N). Esta última se prepara disolviendo 0,8 g de NaOH en 100 ml de agua destilada.

Preparación de la solución de enzima: a partir del polvo liofilizado de la lipoxigenasa de glicina de soja (1-Lox, tipo 1-B, Sigma-Aldrich[®]) de ≥ 50.000 unidades/mg de sólido, se preparó una solución de la enzima con 150 unidades/ml (en buffer).

En el ensayo, cada tubo de reacción contuvo 20 µl de ácido linoleico (sustrato), 15 µl de DMSO, solución de indometacina o extracto (distintos volúmenes), 30 µl de solución de la enzima y el volumen de buffer necesario para llevar a un volumen total de 1800 µl.

La solución de la enzima es lo último que se añadió a la mezcla antes mencionada, e inmediatamente se siguió la cinética de reacción en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu, UV-1800) a 234 nm, durante 6 minutos.

Con los valores de absorbancia a los 6 minutos se calculó el porcentaje de inhibición aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 7

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \times 100$$

Donde $Abs_{control}$ es la absorbancia a los 6 minutos de la reacción en ausencia de inhibidor (extracto o Indometacina) y $Abs_{muestra}$ es la absorbancia a los 6 minutos de la solución que contiene extracto o Indometacina.

Se construyó una curva del porcentaje de inhibición en función de la concentración de inhibidor. Finalmente se interpoló en la curva para tener el valor que inhibe al 50 % de la enzima. Cada

4. Metodología experimental

ensayo se realizó por duplicado y los resultados se expresan como el promedio y su desviación estándar.

Desarrollo y evaluación de las formulaciones para aplicación en piel: hidrogeles y emulgeles

4.6 Desarrollo y selección de los geles y emulgeles

Se diseñaron y prepararon formulaciones del tipo hidrogel y emulgel. La composición cualitativa de las mismas se detalla en las tablas 3-7.

Las formulaciones incluyeron la combinación de extractos seleccionada de acuerdo con el ítem 4.4.2 Técnica del tablero de ajedrez. Formulaciones sin extractos también fueron preparadas, donde la cantidad de extractos se reemplazó por agua, y se denominaron formulaciones “base”. Estas últimas pueden brindar información útil, ya sea en la caracterización o en la evaluación de la estabilidad en el tiempo, a fin de poder conocer si la variación de algún parámetro estudiado se debe a la presencia de los extractos o no.

Antes de incorporar la combinación de extractos en las formulaciones, la mezcla se llevó a sequedad y se re-disolvió en el solvente o mezcla de solventes más apropiados. En la mayoría de los casos se disolvió en una mezcla de propilenglicol y etanol 70° (1:1).

La cantidad de extractos combinado que se incorporó por gramo de gel fue mayor que la concentración inhibitoria mínima hallada en el ensayo 4.4 Determinación del poder antimicrobiano de los extractos.

Es importante destacar que ningún conservante fue empleado en las formulaciones desarrolladas.

Las diferentes formulaciones fueron preparadas teniendo en cuenta la forma farmacéutica y los excipientes elegidos.

En el caso de los hidrogeles con Carbopol® (Tablas 3 y 4), estos fueron preparados de la siguiente manera.

Primero, la mezcla de extractos seca se mezcló con etanol y propilenglicol. Esta mezcla se dejó 30 minutos en el sonicador para facilitar la disolución del extracto. Por otro lado, el Carbopol® se humectó en agua durante 12 horas. Luego, para lograr una correcta homogenización se mezclaron estas preparaciones con un agitador de hélice (Decalab Fbr®) durante 15 minutos. Finalmente se agregó trietanolamina (TEA) y se continuó agitando durante 15 minutos más.

Tabla 3. Composición porcentual (p/p) de formulaciones de hidrogeles con Carbopol® 934

Función	Componentes	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Principio activo	Extractos	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Polímero gelificante	Carbopol®	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	0,5	0,5	1	1
Humectante y cosolvente	Propilenglicol	5	10	-	-	5	10	-	-	2,5	5	2,5	5
	Glicerina	-	-	5	10	-	-	5	10	2,5	5	2,5	5
Co-solvente	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Regulador de pH	TEA	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Vehículo	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

Tabla 4. Composición porcentual (p/p) de formulaciones de hidrogeles con Carbopol® 940

Función	Componentes	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24
Principio activo	Extractos	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Polímero gelificante	Carbopol®	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	0,5	0,5	1	1
Humectante y cosolvente	Propilenglicol	5	10	-	-	5	10	-	-	2,5	5	2,5	5
	Glicerina	-	-	5	10	-	-	5	10	2,5	5	2,5	5
Co-solvente	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Regulador de pH	TEA	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Vehículo	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

En el caso de los hidrogeles preparados con los derivados de celulosas (Tabla 5), estos fueron preparados de la siguiente manera.

Por un lado se dejó humectar el gelificante durante 12 h. Igual que en el método anterior, la combinación de extractos secos se redisolvió en etanol y propilenglicol con ayuda de un sonicador durante 30 minutos. Se agregó la solución de extractos a la dispersión con el gelificante. Se agitó manualmente para incorporar lentamente la solución de extractos a la mezcla. Se continuó con agitación mecánica durante al menos 30 minutos más para homogeneizar la mezcla.

Tabla 5. Composición porcentual (p/p) de formulaciones de hidrogeles con derivados de celulosa.

Función	Componentes	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32
Principio activo	Extractos	3	3	3	3	3	3	3	3
Polímero Gelificante	Metilcelulosa 1000	2	4	6	-	-	-	-	-
	Carboximetilcelulosa (4.000 cPs)	-	-	-	1	2	3	4	6
Humectante	Propilenglicol	5	5	5	5	5	5	5	5
Co-solvente	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5
Regulador de pH	TEA	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Vehículo	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

En el caso de los hidrogeles preparados con Sepigel® (Tabla 6), el polímero se dispersó en agua, luego se incorporó el extracto y finalmente se añadió propilenglicol y etanol. Se agitó mecánicamente durante 30 minutos.

Tabla 6. Composición porcentual (p/p) de formulaciones con Sepigel®

Función	Componentes	F33	F34	F35	F36	F37	F38	F39
Principio activo	Extractos	3	3	3	3	3	3	3
Polímero gelificante y emulsionante	Sepigel® 305	2	3	4	5	6	7	8
Humectante	Propilenglicol	5	5	5	5	5	5	5
Cosolvente	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5
Regulador de pH	TEA	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Vehículo	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

Tabla 7. Composición porcentual (p/p) de los emulgeles que incluyen fase oleosa.

Función	Componentes	F40	F41	F42	F43	F44	F45	F46	F47	F48	F49	F50
Principio activo	Extractos	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Fase oleosa	Alcohol cetosteárico	-	-	-	-	5	5	-	-	-	4	4
	Alcohol cetílico	-	-	2,5	2,5	-	-	-	-	3	-	-
	Alcohol esteárico	-	-	2,5	2,5	-	-	-	-	3	-	-
	Ceral 10	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ceral PW	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-	-
	Ácido oleico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20
Tensioactivo	Span 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	1,2
	Span 80	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	-	-	-
	Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	13
Polímero Viscosante	Polytrap®	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
	Pemulen™ TR1	-	0,3	-	0,3	-	0,4	-	0,5	-	-	-
	Pemulen™ TR2	0,3	-	0,3	-	0,4	-	0,5	-	-	-	-
	Carbopol® 940	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-
	CMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6
Humectante	Propilenglicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
	Glicerina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	-
Regulador de pH	TEA hasta pH 6	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	-	-	-	-
Vehículo	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

En la preparación de los emulgeles (Tabla 7) se emplearon tres métodos diferentes. En uno de ellos, por un lado se preparó una emulsión con el método convencional, es decir, fundiendo los componentes oleosos a una cierta temperatura (58 °C), separadamente, se disolvieron los componentes acuosos a la misma temperatura que los oleosos, y luego se agregó la fase acuosa sobre la oleosa, con agitación mecánica constante. Por otro lado, se preparó un gel y ambos (emulsión y gel) fueron mezclados en una relación 1:1.

Otro método consistió en agregar el gelificante a la fase acuosa de la emulsión, la cual luego se incorporó la fase oleosa y se agitó hasta homogeneizar.

El tercer método consistió en agregar el gelificante a la emulsión ya preparada.

A su vez, en cada método de preparación se probó disolver el extracto en fase oleosa y en fase acuosa.

4.7 Caracterización de los hidrogeles y emulgeles

Una vez obtenidas las diferentes formulaciones, se evaluaron las características organolépticas y las propiedades fisicoquímicas de los preparados bases y de los que vehiculizaron los extractos vegetales. Asimismo, se evaluó la calidad higiénica de los preparados como productos tópicos, ya que los mismos fueron preparados sin conservante antimicrobiano. También se evaluó la capacidad antimicrobiana de los preparados contra cepas bacterianas Gram positivas relacionadas con infecciones de piel.

4.7.1 Evaluación de caracteres organolépticos

Las características de las formulaciones se definieron de acuerdo con la percepción de los sentidos, como el aspecto, color y aroma percibido.

4.7.2 Evaluación de la homogeneidad

Se realizó mediante observación bajo lupa binocular estereoscópica (Arcano[®] ST 30 2L) y microscopio óptico (Leica[™] DM LB2 equipado con cámara digital Leica[™] ICC50HD²) de una delgada capa de producto extendido sobre un portaobjeto.

4.7.3 Evaluación de la extensibilidad

Para evaluar este parámetro se siguió el método propuesto por Fernández-Montes (2005). La muestra (25 mg) se colocó entre dos portaobjetos y a cada minuto, durante 5 minutos, se agregaron pesas de 0,5, 1, 2 y 5 g. El diámetro de la zona expandida del gel fue medido. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se representan en una gráfica del valor del radio medido en función del peso agregado.

² Las fotografías microscópicas fueron tomadas por la Dra. Ana María González en el laboratorio de Anatomía Vegetal-IBONE (UNNE-CONICET).

4.7.4 Evaluación de la textura

El análisis del perfil de textura (ATP, por sus siglas en inglés) se realizó mediante el uso de un texturómetro Brookfield CT3 (Figura 19), empleando la sonda TA11/1000. Se evaluó la dureza y adhesividad de los preparados.

La dureza se define en este caso como la fuerza en gramos (g) necesaria para penetrar 10 mm en el gel.

La adhesividad se define como el trabajo requerido para retirar el gel de la superficie. Se expresa en miliJoule (mJ).

Los parámetros del test fueron los siguientes: celda de carga 4500 g, carga de activación 1 g, velocidad del test 1 mm/s, velocidad de vuelta 1 mm/s, ciclos: 1. El cilindro (contenedor de la muestra) fue de 30 mm de alto y 38 mm de diámetro.

En este ensayo se realizó la compresión sobre el gel hasta alcanzar el máximo valor de la curva (Figura 20), que representa la fuerza de ruptura del gel (dureza). Cuando se retira la sonda, la fuerza empieza a descender y puede que se produzca la curva negativa bajo el eje tiempo, a partir de la cual se obtiene el valor de adhesividad.

Las mediciones se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como el promedio y la desviación estándar.

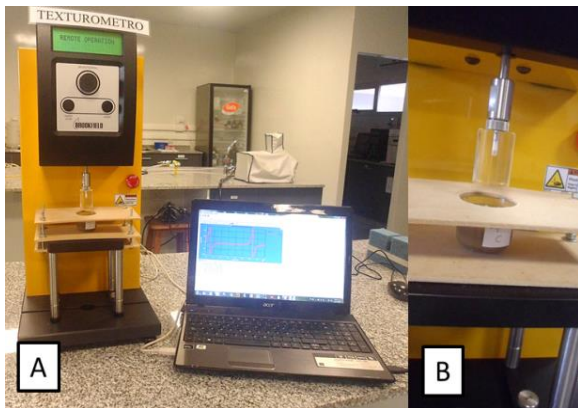


Figura 19. A) Equipo empleado en la determinación de la dureza y adhesividad. B) Imagen acercada de la sonda empleada y del cilindro de la muestra ajustado entre dos placas de madera que lo contienen para evitar que se eleve cuando se levanta la sonda.

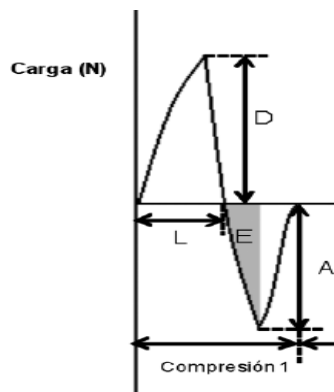


Figura 20. Gráfica ilustrativa del ciclo de compresión-descompresión en un análisis de perfil de textura.

4.7.5 Determinación de la viscosidad

Para determinar la viscosidad dinámica de las formulaciones se empleó un viscosímetro rotacional Brookfield RVT (Massachusetts, EEUU), utilizando de acuerdo a la viscosidad de las muestras las agujas N° 4, 5, 6 y 7. Se determinó la viscosidad a 10 RPM durante 2 minutos en unidades de miliPascal segundo (mPa.s). Las mediciones se realizaron por triplicado y el resultado se expresa como el promedio y la desviación estándar.

4.7.6 Medición de pH y conductividad

La medición de pH y conductividad se realizó por inmersión del electrodo en el seno del preparado. Se empleó un pH-metro y conductímetro portable HANNA® HI 9811-5. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como el promedio y la desviación estándar.

4.7.7 Determinación del poder antimicrobiano

*** Técnica en medio sólido**

Para evaluar el poder antimicrobiano de las formulaciones seleccionadas se empleó la técnica de difusión en pozos. Se procedió de acuerdo a lo establecido por el CLSI (2006). En cada placa se realizaron 6 huecos de 6 mm de diámetro empleando sorbetes de plástico esterilizados. En cada oquedad se colocó 0,025 g de gel a evaluar. También se evaluaron los geles bases, para descartar que la actividad antimicrobiana se deba a un efecto de los excipientes.

El inóculo se preparó como se indica en el punto 4.4.1. Técnica de microdilución en caldo. Cada placa de Petri de 90 mm de diámetro se cargó con 25 ml de Agar Mueller Hinton (MH) fundido. Una vez solidificado el medio en la placa, se realizó la siembra del inóculo con ayuda de un hisopo ginecológico estéril. Posteriormente se hicieron las oquedades empleando un sorbete y finalmente los geles fueron cargados en cada oquedad con ayuda de una jeringa de 1 ml. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se midió el diámetro (en milímetros) del halo de inhibición generado.

Las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como el promedio y la desviación estándar.

*** Técnica en medio líquido**

Además de evaluar la generación de halos de inhibición, se evaluó la cinética de la actividad antibacteriana, empleando un medio líquido, mediante la técnica conocida como “Curva de muerte” o “Time-Kill Assay” (García, 2007). Esta técnica proporciona un modelo de cinética de muerte cuantitativa para los organismos en intervalos de tiempo predeterminados.

De manera similar a como se explicó en el punto 4.4.1. Técnica de microdilución en caldo, se preparó el inóculo bacteriano en solución fisiológica y se vertió 50 µl en tubos con 5 ml de caldo MH ajustado en cationes. Se preparó un tubo de control de crecimiento sin presencia de sustancia inhibidora y otro tubo con la sustancia cuya actividad antibacteriana se estudió.

Para el ensayo se empleó 0,1 g de los distintos geles, conteniendo aproximadamente 400 µg EAG en solución. También fueron evaluados los geles base.

Se tomaron muestras al momento inicial, a las 4, 8, 12 y 24 h. Cada muestra extraída de los distintos tubos fue diluida en solución fisiológica. Luego, 10 µl de esa dilución se pasó a una placa con Agar MH, se esparció empleando un asa de Digralsky. Se incubó por 24 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo se contaron las colonias que crecieron y se multiplicó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por el factor de dilución empleado en la muestra sembrada en la placa. Luego, a este resultado se le aplicó el logaritmo en base 10 para finalmente graficar el resultado del logaritmo calculado en función del tiempo.

4.7.8 Control higiénico

La contaminación microbiológica es un factor importante en la calidad de un producto farmacéutico; para evitarla es necesario mantener buenas prácticas en el laboratorio; materiales y ambientes cuidadosamente higienizados.

El control higiénico se realizó de acuerdo a lo establecido por Farmacopea Argentina Séptima Edición (Volumen I, 2003) para productos no obligatoriamente estériles. Para ello, 1 g de cada gel fue disperso en 10 ml de buffer fosfato pH 7,2, y luego se tomó el volumen indicado de muestra para cada ensayo.

Recuento de aerobios viables: procedimiento en placa

Se transfirió 1 ml de muestra a una placa de Petri estéril, se agregó rápidamente 20 ml de Agar Digerido Caseína de Soja, previamente fundido y enfriado a 45 °C, se homogeneizó, se dejó solidificar y finalmente se llevó a incubación a 37 °C durante 48 a 72 h.

Ensayo para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Se transfirió 1 ml de la suspensión de muestra a un tubo con 10 ml de Caldo Digerido de Caseína de Soja, se mezcló e incubó a 37 °C durante 24 h. En caso de observarse turbidez luego del período de incubación, se tomaron muestras del tubo con un ansa y se inoculó la superficie de una placa conteniendo Agar Manitol-Sal para detectar presencia de *S. aureus* y se repitió el

procedimiento en otra placa con Agar Cetrimida para determinar presencia de *P. aeruginosa*. Se tapó y dejó incubar durante 24 h a 37 °C.

Las colonias de *S. aureus* se observan de color amarillas sobre el medio colorado del Agar Manitol-sal, mientras que las de *P. aeruginosa* se observan blancas verdosas en Agar Cetrimida.

Ensayo para enterobacterias: procedimiento en placa

Se procedió según lo indicado para Recuento de aerobios viables: procedimiento en placa, pero el medio de cultivo empleado fue Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa. Se dejó incubar 72 h a 37 °C.

El resultado es positivo si se observan colonias rojas con halo de precipitación rojo.

Recuento de hongos y levaduras

Se procedió de acuerdo a lo descripto para Recuento de aerobios viables: procedimiento en placa, usando en este caso el medio de cultivo Agar Dextrosa-Sabouraud. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 5 días.

4.8 Estudio de estabilidad de los geles

4.8.1 Evaluación de la estabilidad física

Para las formulaciones en gel se dividió cada lote de 6 pots, en dos grupos con 3 pots cada uno. Uno fue almacenado a 40 °C y 75 % de humedad relativa (HR) durante 6 meses (Amit, Saraswati, Kamalesh, & Kumud, 2013). Después de este tiempo, se mantuvo el ambiente con 75 % HR, pero se los conservó a temperatura ambiente, durante un año, después del cual se conservó en condiciones ambiente sin control de la humedad relativa.

La otra parte del lote se conservó en condiciones ambiente desde el principio.

La temperatura y la humedad ambiente muestran rangos muy variables en la provincia del Chaco. Debido a ello, estos dos parámetros fueron registrados una vez al día durante el primer año de ensayo. Luego se promediaron estos valores.

A estas formulaciones se les midió pH, conductividad, extensibilidad, viscosidad, contenido de compuestos fenólicos, actividad antibacteriana y se le realizó el control higiénico a las 24 horas de elaborados, al mes, 3, 6, 12 y 24 meses, además de evaluarse las características generales.

4.8.2 Evaluación de la estabilidad química

Se determinó el contenido de fenoles totales provenientes de los extractos vegetales extraídos de los hidrogeles con etanol de 70°. Para ello se dejó en contacto durante 24 horas, 0,1 g del respectivo gel con 1 ml de etanol 70°, con el fin de extraer los polifenoles vehiculizados en el gel. La cuantificación de los polifenoles se realizó por espectrofotometría UV-visible a 760 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), mediante interpolación en la curva de calibración que se describió en el ítem 4.3.2.2 Determinación del contenido de polifenoles totales. El resultado se expresó en microgramos equivalentes de ácido gálico (sustancia de referencia) por gramo de gel (μg EAG/g). La determinación se hizo por triplicado.

Las mediciones se realizaron a las 24 horas de elaborados, al mes, 3, 6, 12 y 24 meses.

4.8.3 Evaluación de la estabilidad microbiológica

Los productos evaluados se controlaron en cuanto al contenido de microorganismos aerobios viables, enterobacterias, hongos y levaduras, y presencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y. El procedimiento experimental se siguió según las especificaciones indicadas por la Farmacopea Argentina (2003) en el apartado sobre ensayos de control higiénico para formulaciones no estériles.

Los ensayos se realizaron al inicio, al mes, a los 3, 6, 12 y 24 meses para los geles. Los resultados se evaluaron considerando los criterios de aceptación especificados para formulaciones de uso tópico.

4.9 Estudio de permeación *in vitro* de polifenoles en geles

Siempre que un producto entre en contacto directo con la piel o las mucosas, una parte logrará permear hacia la vía sistémica. Es importante conocer cómo se comporta un preparado farmacéutico, si permea o no, y en caso de permear, qué concentración lo hace.

El estudio de permeación se realizó mediante el uso de celdas de tipo Franz, empleando buffer pH 7 como medio interno, piel de origen animal como membrana, donde la cara interna estuvo en contacto con el buffer y la parte externa en contacto con el producto farmacéutico. El estudio se realizó con agitación magnética constante.

Se empleó piel de oreja de cerdo obtenida de frigoríficos de la ciudad de Sáenz Peña (Chaco). Se las cortó cuidadosamente con un bisturí y se midió el espesor de los cortes empleados. Se seleccionaron pieles con espesores similares. La temperatura de trabajo fue 32 °C. La piel se humectó antes del ensayo, sumergiéndola en buffer durante 30 minutos. Los geles se cargaron

mediante jeringas de 1 ml y la cantidad cargada se calculó por diferencia de peso de la jeringa con gel y el peso de la jeringa después de cargar el gel en el compartimento dador.

Se tomaron 1000 µl del medio interno de la cámara receptora de cada celda a los 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 minutos. El volumen extraído fue repuesto con la misma cantidad de buffer a la misma temperatura. Las muestras fueron almacenadas en tubos eppendorf a -20 °C hasta su análisis. Las muestras (a temperatura ambiente) fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante cinco minutos para sedimentar las células de piel que pudieron haber pasado al medio líquido. Luego, dos alícuotas de 450 µl extraídos de cada tubo eppendorf se analizaron por espectrofotometría, mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La cantidad permeada fue calculada por interpolación en la curva de calibración elaborada con ácido gálico.

Finalizado el ensayo, se extrajo cuidadosamente el remanente de producto sobre la piel, se dejó en 5 ml de etanol 70° durante 24 h. Luego de este tiempo se analizó la cantidad de compuestos fenólicos remanentes en cada celda de ensayo, del mismo modo en que se describió anteriormente, mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu.

También se determinó la concentración de compuestos fenólicos retenidos en el epitelio. Para eso, la piel fue cortada en trozos pequeños y fue sumergida en 5 ml de etanol 70° durante 24 h. Pasado este tiempo se analizó del mismo modo que las muestras del medio interno.

El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se representan en una curva con el valor permeado acumulado promedio por unidad de área en función del tiempo.

A partir de la porción lineal de la curva, se obtuvo la ecuación de regresión lineal. El valor de la pendiente es el valor del flujo de permeación (J) y da información de la cantidad de polifenoles que permean por unidad de área y por unidad de tiempo. Su unidad es µg EAG/cm².h.

Al dividir el flujo obtenido por los fenoles cargados en el compartimento dador al inicio del ensayo (dosis), se obtiene el coeficiente de permeabilidad o coeficiente de difusión (Kp), el cual da información sobre la velocidad con que los componentes del extracto atraviesan la membrana, y su unidad es cm/h.

A partir de los valores de polifenoles permeados y retenidos en piel al finalizar el ensayo, se calculó el porcentaje de polifenoles permeados y retenidos en piel, tomando como referencia la cantidad cargada en el compartimento dador al inicio del ensayo.

Desarrollo y evaluación de las formulaciones para uso en la mucosa oral: películas o *films* bucales

4.10 Preparación y selección de las películas

Para la elaboración de las películas o *films* bucales se utilizó el método conocido como “*film casting*” o método de evaporación del solvente, en el cual se prepara una solución de la mezcla polímero-extractos, luego se deja evaporar el solvente en un molde, y finalmente se forma la película.

Las soluciones fueron elaboradas a temperatura ambiente, empleando dos tipos de moldes: i) en contenedores de silicona con oquedades de 12 mm de diámetro, y ii) en placas de Petri de 9 mm de diámetro. Luego el solvente fue evaporado a 40 °C en una estufa con circulación de aire durante 24 h.

En las Tabla 8, 9 y 10 se detalla la composición cuali-cuantitativa de las películas probadas en esta etapa.

Al momento de seleccionar las fórmulas más promisorias se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Que el extracto se incorpore en la mezcla.
- Que todos los componentes de la mezcla líquida se encuentren disueltos o suspendidos sin que se aprecie visualmente una separación de fases.
- Que se forme una película.
- Que la película tenga una apariencia homogénea.
- Que se pueda desprender del molde usado.
- Que no se adhiera a los dedos o utensilios con los que se manipula.

Modo de preparación

Todos los componentes de las formulaciones fueron pesados en una balanza digital, inclusive los líquidos.

Preparación del extracto

La mezcla líquida de extractos se llevó a sequedad en estufa con recirculación de aire, a 40 °C, hasta obtener un peso constante. Luego se redisolvió empleando 5 g de propilenglicol y 1,66 g de etanol 70° por cada gramo de extracto.

Preparación de las soluciones de HPMC

Para elaborar las dispersiones cuya composición se indica en la tabla 8, primero se dispersó HPMC en agua, se dejó humectar durante 24 h en heladera (8 °C). Transcurrido este tiempo, se adicionó la solución de los extractos en propilenglicol y etanol. Luego, se agitaron a una velocidad moderada, con agitador de hélice, durante 2 h y se dejó reposar 24 h a 8 °C. Finalmente se vertieron en los moldes y se llevaron a estufa para evaporar los solventes.

Una vez seleccionada la combinación óptima de los componentes en la formulación que permita lograr una película de aspecto agradable, se varió la proporción de sacarina a incorporar, como se indica en las formulaciones P12, P13 y P14 de la tabla 9. En esta instancia la sacarina se incorporó al agua donde se dispersa la HPMC, el resto del procedimiento es el mismo.

Preparación de las soluciones con Eudragit®

Se disolvió el polímero en una cantidad de acetona, se agitó por 30 minutos con ayuda de un agitador magnético hasta disolución. Durante esta etapa se mantuvo el recipiente cerrado con papel aluminio y film, para evitar la evaporación del solvente. Una vez disuelto se añadió la solución de extractos, se agitó con varilla de vidrio, luego se añadió la sacarina y la mezcla de alcohol isopropílico y etanol. La solución se agitó magnéticamente durante 2 h, con el vaso de precipitado cuidadosamente tapado, luego se dejó reposar 24 h a 8 °C, finalmente se vertieron en los moldes y se llevaron a estufa para evaporar los solventes.

Luego de seleccionar la combinación de excipientes óptima para lograr una película adecuada, se prepararon películas con una combinación de estos dos tipos de Eudragit® (P33), la composición se indica en la tabla 10.

Preparación de las soluciones con HPMC y Eudragit®

Se prepararon dispersiones de HPMC y Eudragit® como se explica en los ítems anteriores, pero con una concentración de cada polímero equivalente al doble de la deseada en la formulación final. Se mezclaron en una proporción 1:1, es decir, por ejemplo, 50 g del gel de HPMC al 2 % con 50 g de la solución de Eudragit® al 2 % y se obtiene finalmente 100 g de una dispersión que contiene HPMC al 1 % y Eudragit® al 1 %. Durante el proceso de elaboración, la agitación fue un factor clave para poder homogeneizar completamente, por lo que se mezclaron con el agitador de hélice durante 2 horas, luego con agitador magnético durante otras 2 horas y se las dejó reposar en heladera 24 h para que se eliminen las burbujas que se pudieran haber incorporado durante el mezclado. Transcurridas las 24 h, las soluciones fueron cargadas en los moldes de silicona y en placas de Petri. La composición de las soluciones formadoras de estas películas se indica en la tabla 9 (P15-P20).

4. Metodología experimental

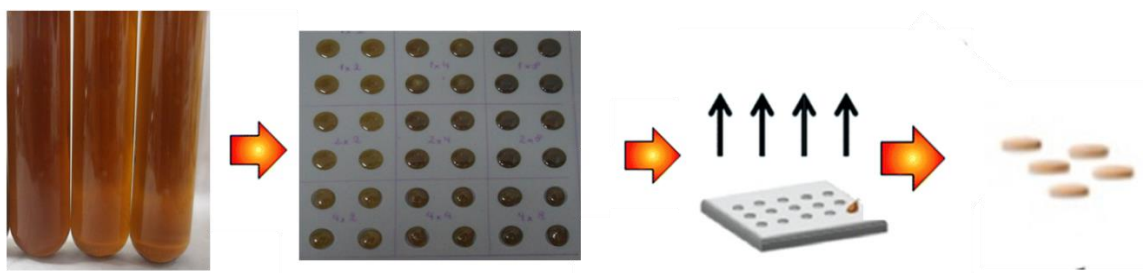


Figura 21. Esquema general del método de evaporación del solvente, empleado para la elaboración de las películas.

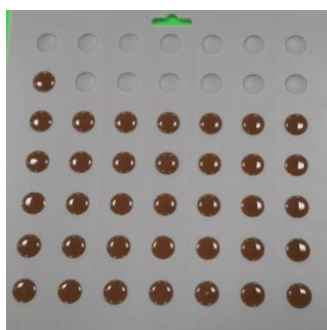


Figura 22. Molde de silicona con 49 oquedades de 12 mm de diámetro, empleado en la elaboración de las películas.

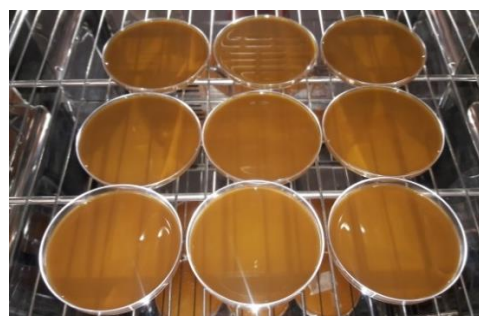


Figura 23. Placas de Petri plásticas cargadas con las soluciones formadoras de películas

Tabla 8. Composición porcentual de las soluciones formadoras de películas a base de HPMC sin emplear edulcorante.

Función	Componentes	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Polímero													
formador	HPMC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
de película													
Principio activo	Extracto	0,75	1,5	3	0,75	1,5	3	0,75	1,5	3	0,75	1,5	3
Plastificantes	Propilenglicol	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15	15	15
	Glicerina	-	-	-	10	10	10	20	20	20	-	-	-
Solventes	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

Tabla 9. Composición porcentual de las soluciones formadoras de películas a base de HPMC con edulcorante.

Función	Componentes	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Polímero formador de película	HPMC	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Eudragit® L 100	-	-	-	1	1	1	-	-	-
	Eudragit® L100-55	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Principio activo	Extracto	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Plastificantes	Propilenglicol	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edulcorante	Sacarina	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
Solventes	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente

Tabla 10. Composición porcentual de las soluciones formadoras de películas a base de Eudragit®.

Componentes		P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33
Polímero formador de película	Eudragit® E 100	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Eudragit® S 100	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	Eudragit® L 100	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	0,5
	Eudragit® L 100-55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	0,5
Principio														
Activo	Extracto	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Plastificante	Propilenglicol	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	15
Solventes	Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Acetona	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

c.s.: cantidad suficiente.

4.11 Caracterización de las películas bucales

4.11.1 Caracterización organoléptica

Se evaluaron las características organolépticas de las películas. En este tipo de formas farmacéuticas es importante el aspecto general y, además de su olor y color, es necesario tener en cuenta el sabor. Estos parámetros se describieron de acuerdo a como fueron percibidos por los sentidos.

4.11.2 Determinación de homogeneidad

En una evaluación *a priori*, las películas se observaron a simple vista, luego, se utilizó una lupa binocular estereoscópica (Arcano ST 30 2L) y un microscopio óptico (marca Seiss modelo Primo Star) para observar la presencia de burbujas, heterogeneidad en el color o presencia de partículas que no se hayan disuelto.

4.11.3 Medición de pH

Se realizó mediante el uso de tiras reactivas. Las películas se humedecieron en agua destilada, después de 3 minutos se los extrajo, se secó con cuidado la superficie de los mismos y se pusieron en contacto directo con la tira medidora de pH.

4.11.4 Medición del espesor

Se realizó mediante el empleo del medidor de espesor Microprocessor CM-8826FN, el cual puede medir espesores en un rango de 0 – 1250 μm .

4.11.5 Determinación de las propiedades mecánicas

Este ensayo mide la resistencia de las películas sometidas a una fuerza aplicada lentamente.

La resistencia a la rotura de las películas se determinó mediante la norma ASTM D882-02 (2002) con algunas modificaciones, empleando un texturómetro Brookfield CT3TM en modo tracción.

Para este ensayo se cortaron tiras de 70 mm de largo por 10 mm de ancho, para poder sujetarlas a las mordazas del equipo, en el extremo se añadió (en sentido perpendicular) cinta adhesiva de papel de 10 mm de ancho, formando una “T”, como se puede observar en la figura 24.

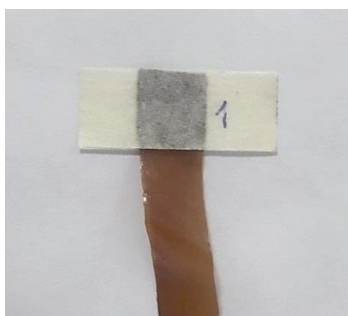


Figura 24. Tira de película con cinta adhesiva en su extremo colocada en forma transversal para usarla en el ensayo de tracción.

La tira se sujetó entre dos mordazas. La mordaza inferior, en la base del equipo, se mantuvo fija, mientras que la mordaza superior fue móvil. La separación de agarre inicial se estableció en 50 mm, y la velocidad de estiramiento se estableció en 0,5 m/s. Una vez iniciado el ensayo, la mordaza superior comienza a ascender, provocando el estiramiento de la película hasta su ruptura. La prueba se repitió cinco veces para cada fórmula de película. En el software del equipo se registra tensión o esfuerzo (N/mm^2) en función de deformación de la película (mm).

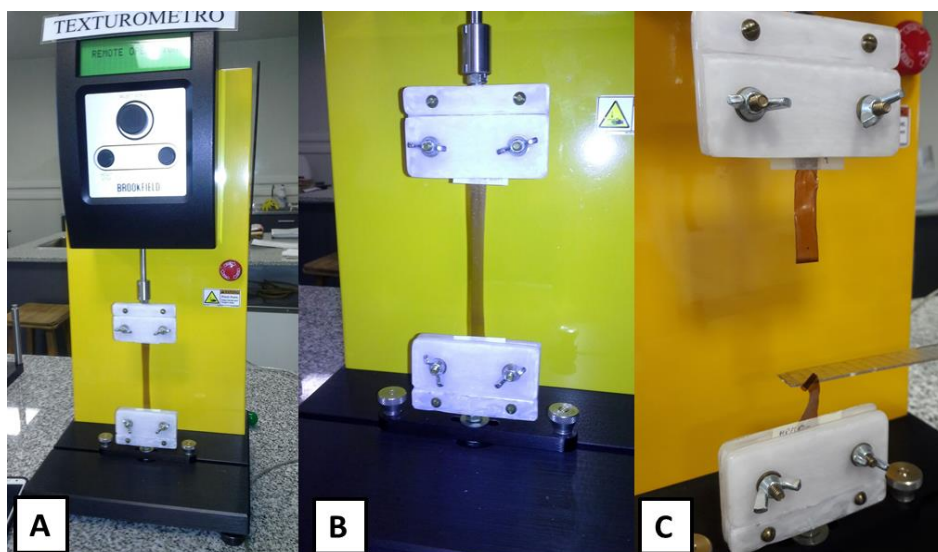


Figura 25. Imágenes propias de: A) Texturómetro Brookfield CT3™ empleado para determinar la resistencia a la rotura. B) estiramiento de la película durante la determinación de la resistencia a la rotura. C) Película rota a la mitad, resultado del ensayo.

4.11.6 Determinación de la resistencia al doblamiento

Las películas se doblaron manualmente, hacia ambos lados, hasta 100 veces o hasta que se quebraron. Se registró el número de veces que se dobló hasta quebrarse.

4.11.7 Determinación del índice de humectación

Considerando que estas películas son propuestas para usar en la cavidad bucal, es necesario conocer la cantidad de agua que pueden absorber en un tiempo determinado, la magnitud en la que se hinchan y aumentan de tamaño por retención del agua en su interior. Es importante y deseable que no aumente demasiado su tamaño porque de lo contrario podría generar molestias en el lugar donde se aplique.

Para la realización de este ensayo se siguió el procedimiento explicado por Meher Gopal et al., (2013). Cada película fue pesada antes de iniciar el ensayo, y este valor de peso fue registrado como P_1 . Luego, la película fue colocada en un vaso de precipitados pequeño conteniendo 5 ml de buffer fosfato pH = 6,8. A los 60 segundos, el film fue extraído y cuidadosamente se limpió el exceso de líquido empleando un papel absorbente. El peso de la película humectada fue registrado como P_2 . El índice de humectación de la película fue calculado usando la siguiente fórmula:

Ecuación 8

$$\% IH = \frac{P_2 - P_1}{P_2} \times 100$$

Donde % IH es el índice de humectación expresado en porcentaje, P_1 es el peso inicial de la película sin humectar y P_2 es el peso de la película humectada.

La determinación se realizó por triplicado y el resultado se expresa como el valor de % IH promedio y la desviación estándar.

4.11.8 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad (H) fue determinado como la fracción de pérdida de peso de la película inicial durante el secado. Pequeñas muestras de películas ($1 \pm 0,01$ g) fueron cortadas y colocadas en crisoles secos (previamente pesados) y llevados a estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido de humedad fue calculado con la siguiente expresión:

Ecuación 9

$$\% H = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100$$

Donde H es el contenido de humedad expresado como porcentaje (p/p); P_i es el peso inicial de la película (g); P_f es el peso final de la película (g).

4.11.9 Estudio de liberación *in vitro*

El estudio de liberación *in vitro* de los polifenoles se realizó empleando frascos de vidrio color caramelo con 15 ml de buffer fosfato pH 6,8 a 37 °C y con agitación magnética constante.

Para este ensayo se tomaron películas con pesos y espesores similares. Una vez iniciado el ensayo se tomaron muestras de 200 µl a diferentes tiempos, reponiendo el mismo volumen de buffer retirado para mantener el volumen constante. El ensayo se realizó durante 2 horas.

La cuantificación de los polifenoles liberados se determinó mediante el método colorimétrico empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), por interpolación en la curva de calibración. Los resultados se representaron en un gráfico como el valor promedio del porcentaje liberado acumulado de polifenoles en función del tiempo.

Con el fin de describir la cinética de liberación, los datos obtenidos en este ensayo fueron ajustados a distintos modelos matemáticos empleando el complemento de Excel, DDSolver. Este programa fue desarrollado para facilitar el modelado y la comparación de los datos de disolución de medicamentos, es el primer programa reportado que está diseñado específicamente para evaluar la similitud entre los perfiles de disolución y puede considerarse confiable para el análisis de datos de disolución. El programa es capaz de realizar la mayoría de las técnicas existentes para comparar los datos de liberación del fármaco e implementa varias funciones para caracterizar las curvas de liberación de fármacos y para evaluar la similitud entre los perfiles de disolución (Zhang et al., 2010).

Los datos experimentales se ajustaron a cinco modelos: orden cero, orden uno, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin.

4.11.10 Determinación de las propiedades mucoadhesivas *in vitro*

La retención o adhesión de la forma farmacéutica tipo película es un factor que determina el éxito o el fracaso del sistema de administración bucal del fármaco.

Para medir la capacidad de adhesión de las películas a la mucosa, se procedió según el método desarrollado por (Peh & Wong, 1999)(Wong, Yuen, & Peh, 1999), empleando un equipo texturómetro Brookfield CT3™. Este ensayo también es conocido como “ensayo del buche de pollo”.

El buche de pollo es una bolsa membranosa que forma parte del sistema digestivo de estas aves, está comunicado con el esófago y tiene como función el acumular alimento para digerirlo

lentamente. Este tejido se emplea para determinar la mucoadhesión debido a que es similar a la mucosa oral humana.

Para esta determinación, se empleó un buche obtenido de un pollo criado y faenado en una granja familiar. Inmediatamente, luego de ser faenado el animal, se extrajo el buche, se lo lavó y almacenó en buffer fosfato (pH = 6,8) hasta el momento de su uso.

Para este ensayo se construyó una base soporte para el buche, siguiendo el modelo explicado por Wong et al., (1999), especialmente adaptada a la base del texturómetro. El buche fue sujetado a la base con un precinto metálico. Películas cortadas en cuadrados fueron sujetados con ayuda de cinta adhesiva a la sonda cilíndrica N° TA10 del texturómetro, con diámetro de 12 mm (Figura 26).

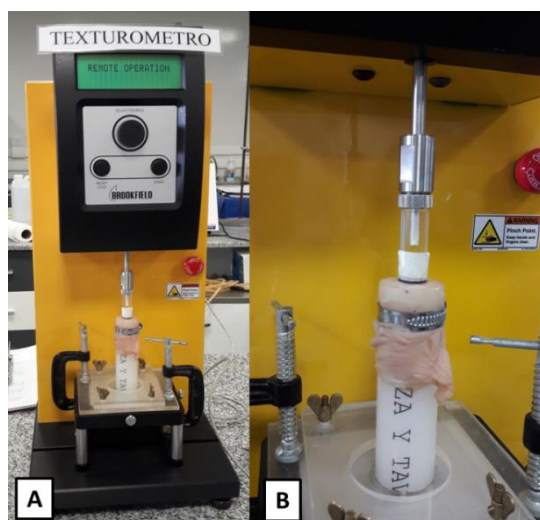


Figura 26. A) Equipo empleado en la determinación de la mucoadhesión. B) Imagen ampliada de la estructura construida para el soporte del buche de pollo.



Figura 27. Secuencia del desprendimiento de una película de la superficie del buche de pollo, durante la determinación de la mucoadhesión.

Al inicio del ensayo, se agregó 100 µl de buffer fosfato a la superficie del buche. La sonda con la película descendió, se dejó en contacto con la mucosa del buche por 300 segundos, luego se retiró a una velocidad de 1 mm/s. La fuerza necesaria para desprender la película del buche fue

registrada y se informa como el valor promedio de 3 mediciones y la desviación estándar. Se expresa en miliJoule (mJ).

Para cada nueva determinación, el buche se limpió cuidadosamente con un papel absorbente y se volvió a agregar 100 µl de solución buffer a la superficie de la mucosa.

4.11.11 Determinación del poder antimicrobiano

Técnica en medio sólido

Para evaluar el poder antimicrobiano de las películas se procedió de manera similar a como se explica en el punto “4.7.7 Determinación del poder antimicrobiano Técnica en medio sólido”. A diferencia de los geles, no se realizaron perforaciones en el medio sólido, sino que luego de sembrar el inóculo sobre la superficie del medio, las películas circulares, de 12 mm de diámetro fueron depositadas directamente sobre el medio. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Técnica en medio líquido

Se procedió del mismo modo en que se explica previamente para “4.7.7 Determinación del poder antimicrobiano Técnica en medio líquido”.

Para este ensayo se emplearon 2 films circulares que se agregaron a cada tubo, conteniendo aproximadamente 2400 µg EAG en solución.

4.12 Estudio de la estabilidad de las películas

4.12.1. Evaluación de la estabilidad física

La estabilidad física en el tiempo se evaluó teniendo en cuenta las consideraciones generales establecidas por la Farmacopea Argentina (2003).

En particular, se consideró el hecho de que las películas son una forma farmacéutica deshidratada y que además contiene extractos vegetales, cuyos metabolitos pueden ser sensibles tanto a la temperatura como la humedad. Por eso, en este caso se han estudiado condiciones de almacenamiento con más variaciones. Las películas cortadas de un tamaño de 10 mm por 20 mm, fueron colocadas sobre papel manteca, y a su vez dentro de un envase de plástico con cierre hermético para poder lograr un ambiente con humedad controlada. Se las sometió a 0% HR la cual se logró con la inclusión de 50 g de sílica gel deshidratada y, a 58 % HR (ASTM D882-02, 2002) logrado con una solución saturada de nitrato de magnesio. A su vez se sometieron a distintas temperaturas de almacenamiento: 8 °C, 40 °C y temperatura ambiente (25 °C). Por otro lado se conservaron dos grupos en condiciones ambiente, uno de ellos en un sobre de papel sin envase

hermético que lo proteja de los cambios de humedad del ambiente, y el otro dentro de un envase de plástico hermético sin elementos para controlar la humedad del recipiente, donde se depositaron las películas inmediatamente luego de ser obtenidas y cortadas.

Tabla 11. Condiciones de temperatura y humedad para el estudio de estabilidad de películas orales.

Condiciones de humedad relativa	Condiciones de temperatura		
	8 °C	25 °C	40 °C
Sin control	-	✓	-
0%	✓	✓	✓
58 %	✓	✓	✓

A cada formulación de película se le hizo el seguimiento de pH, color, olor y apariencia general, contenido de compuestos fenólicos y resistencia al doblamiento a las 24 horas de elaborados, al mes, 3, 6 y 12 meses.

4.12.2. Evaluación de la estabilidad química

Se determinó el contenido de fenoles totales provenientes de los extractos vegetales extraídos de las películas con buffer pH 6,8. Para ello se disolvió una película de cada formula, cuya área fue de 200 mm² en 1 ml del buffer. Se seleccionó este medio después de probar distintos solventes (buffer, etanol 70° y agua destilada) para extraer los polifenoles incorporados en la películas y determinar que el buffer pH 6,8 fue el único en el que lograron disolverse completamente y así liberar los polifenoles presentes. Para asegurar una disolución completa de las películas, se las dejó en contacto con el buffer durante 24 h.

La cuantificación de los polifenoles se realizó por espectrofotometría UV-visible a 760 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). El resultado se expresó en microgramos equivalentes de ácido gálico por película (µg EAG/película). La determinación se hizo por triplicado.

Las mediciones se realizaron a las 24 horas de elaborados, al mes, 3, 6, 12 y 24 meses.

4.12.3. Evaluación de la estabilidad microbiológica

Los productos evaluados se controlaron en cuanto al contenido de microorganismos aerobios viables, enterobacterias, presencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y hongos y levaduras. El procedimiento experimental se siguió según las especificaciones indicadas

4. Metodología experimental

por la Farmacopea Argentina (2003) en el apartado sobre ensayos de control higiénico para formulaciones no estériles.

Los ensayos se realizaron al inicio (24 h de elaboradas), al mes, a los 3, 6, 12 y 24 meses. Los resultados se evaluaron considerando los criterios de aceptación especificados para formulaciones de uso tópico.

4.13 Estudio de permeación *in vitro* de polifenoles en películas

Para determinar permeación bucal de los polifenoles en las películas se empleó mucosa oral de cerdo, la cual se extrajo de la parte interna de la mejilla de animales faenados en frigoríficos de la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña (Chaco). Para separar el tejido epitelial del tejido conectivo, se sumergió el corte en agua destilada a 70 °C durante 20 minutos (Chen, Huang, Lai, & Ling, 2013). La temperatura del ensayo fue de 37 °C. La mucosa se humectó antes del ensayo, sumergiéndola en buffer durante 30 minutos. En cada compartimento dador se cargó un film. Se seleccionaron los films con peso y espesores similares. Durante el ensayo de permeación bucal, se añadió 100 µl de buffer al compartimento dador cada treinta minutos para mantener la película humectada y lograr un comportamiento similar al de la cavidad bucal.

Luego se procedió como se explica en la sección 4.9 Estudio de permeación *in vitro* de polifenoles en geles.

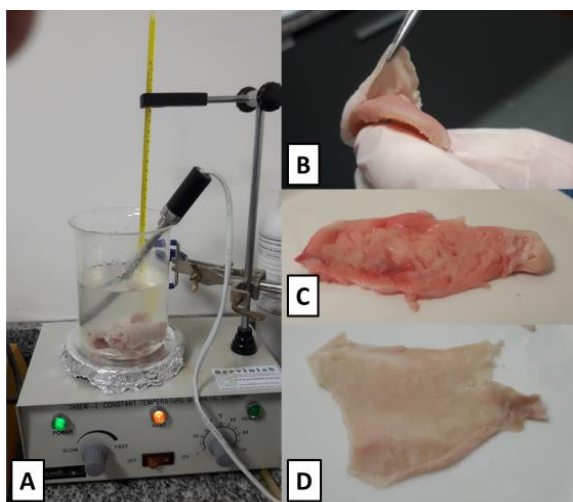


Figura 28. Mucosa porcina empleada en el ensayo de permeación oral. A) Corte de la mejilla de cerdo en baño de agua a 70 °C. B) Desprendimiento del epitelio bucal después del tratamiento térmico. C) Epitelio bucal antes del tratamiento térmico. D) Epitelio bucal extraído después del tratamiento térmico.



Figura 29. Sistema de celdas de Franz empleado para la determinación de permeación de polifenoles. A) Sistema montado en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la UNCAus. B) Imagen acercada de las tres celdas empleadas en el ensayo.

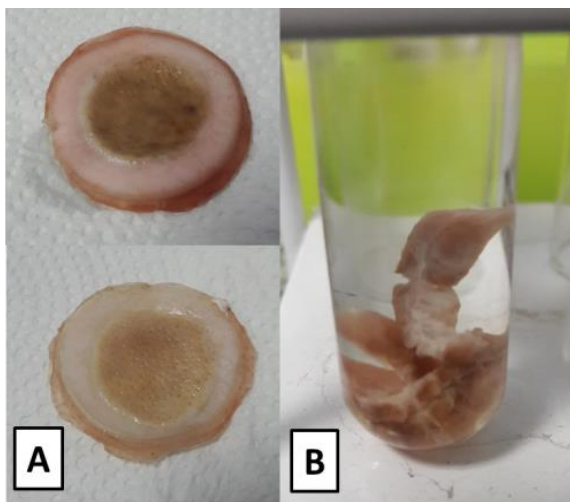


Figura 30. Corte de epitelio después del ensayo de permeación. A) Epitelios impregnados de los extractos después de quitar la formulación remanente que no se absorbió. B) Epitelios cortados sumergidos en 5 ml de etanol 70°.

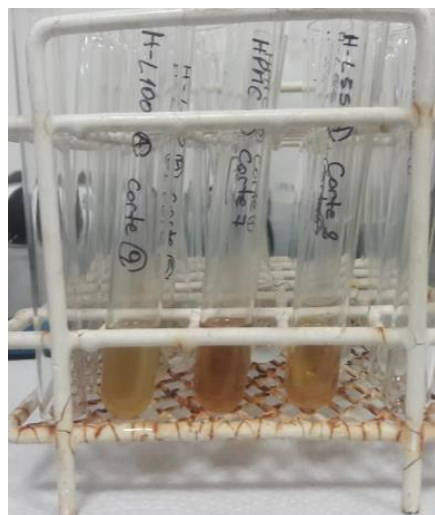


Figura 31. Soluciones etanólicas coloreadas por los extractos luego de 24 h de contacto con los trozos de epitelio.

Determinación del Coeficiente de Reparto (Q)

Para comprender el comportamiento del extracto en contacto con la piel se determinó el coeficiente de partición del mismo entre octanol y buffer (pH 7).

Primero se elaboró una curva de calibración de la mezcla compleja del extracto y así poder cuantificarlo. Se prepararon diluciones seriadas de las combinaciones de extracto, se midió el espectro de absorción de las distintas diluciones en el rango de longitudes de onda comprendidos entre 200 y 800 nm. Se tomaron los picos máximos de los espectros en distintas concentraciones y se construyó una gráfica lineal (concentración vs. absorbancia), la cual se empleó para cuantificar el extracto en las fases acuosas y oleosas.

En dos ampollas de decantación se cargaron octanol y buffer y se dejaron en contacto durante 12 h, para que ambas fases se saturaran una con la otra. Transcurrido ese tiempo, a una de ellas se le agregó 60 mg de extracto seco, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 6 h. A la segunda ampolla se le agregó el extracto disuelto en propilenglicol y etanol, en las mismas proporciones en que fue empleado para los geles y películas, y se dejó reposar 6 h.

Luego se separaron las fases, se midió el espectro de absorción de ambas fases. En cada medición se realizó un blanco con octanol y buffer, según correspondiese.

Las concentraciones de cada fase se obtuvieron por interpolación en la curva de calibración, tomando como dato el valor de absorbancia del pico más alto en las muestras.

Los máximos de absorbancia empleados para construir la curva de calibración y el análisis de las muestras corresponden a la misma longitud de onda.

Una vez obtenidas las concentraciones en cada fase se calcula el cociente entre ellas y se aplica el logaritmo en base 10:

Ecuación 10

$$Q = \text{Log}_{10} \frac{C_{org}}{C_{ac}}$$

Donde Q es el coeficiente de repartición, C_{org} representa la concentración en la fase orgánica y C_{ac} la concentración en fase acuosa.

4.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS 21.0 (IBM Corp, Armonk, NY, E.E.U.U.). En algunos análisis se aplicó una prueba T para comparación de medias, mientras que en otros se aplicó análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tuckey. En ambos casos, un valor de p menor a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características y evaluación de las especies vegetales

5.1 Composición de los aceites esenciales

Para poder ser empleadas con fines terapéuticos, las drogas vegetales tienen que ser sometidas a ensayos o pruebas que permitan controlar y garantizar la calidad de las mismas. Esto es necesario porque generalmente hay una gran cantidad de factores que afectan a la calidad de la materia prima cuando se trata de hierbas, como por ejemplo: la técnica de extracción, la parte usada en la extracción, la estación de cosecha, las condiciones climáticas y el ambiente donde las plantas son cultivadas.

En nuestro caso, el análisis de los aceites esenciales mediante cromatografía gaseosa y espectrometría de masas, permitió determinar los compuestos mayoritarios, encontrando que la especie de *L. turbinata* corresponde al quimiotipo limoneno y que la especie *L. alba* corresponde al quimiotipo citral.

Empleando cromatografía gaseosa acoplada a masa (GS-MS), se ha encontrado que la especie *L. turbinata* presentó como compuestos principales del aceite esencial una mezcla racémica de (+)-limoneno (63,6%, tiempo de retención 14,1 minutos) y carvona (34,6%, tiempo de retención 21,9 minutos), sumando un total de 98,2% de los compuestos presentes en el AE. El resto de los componentes minoritarios no pudieron ser identificados, uno de ellos presenta un pico a los 12,1 minutos (1,3 %) y el otro a los 26,7 minutos (0,5 %). En la figura 32 se muestra el cromatograma del AE de *L. turbinata* y en las figuras 33 y 34 se pueden apreciar los patrones de fragmentación obtenidos para los compuestos identificados.

En especies de *L. turbinata* recolectadas en la provincia de La Rioja se encontró como componente mayoritario al limoneno (50%) y al óxido de piperitenona (30%) (Juliani et al., 2004). Resultados similares se encontraron para especímenes recolectados en la provincia de San Luis (Duschatzky, Bailac, Firpo, & Ponzi, 1998), mientras que especies recolectadas en la provincia de Córdoba expresaron limoneno como principal constituyente pero no óxido de piperitenona (Juliani et al., 2004). En especies de Rio Cuarto (Córdoba), sus componentes mayoritarios fueron epóxido de β -cariofileno (36,48 %), (\pm)-limoneno (21,83 %), piperitenona (16,79 %) y en menor proporción β -cariofileno y (7,98 %) y α -cariofileno (2,59 %) (Passone y Etcheverry 2014). En especies recolectadas en Salta el principal componente fue el limoneno (84,3%), también se encontró β -cariofileno (6,1%), alcanfor (1,5%), óxido de piperitenona (1,3%) y carvona (1,1%).

5. Resultados y discusión

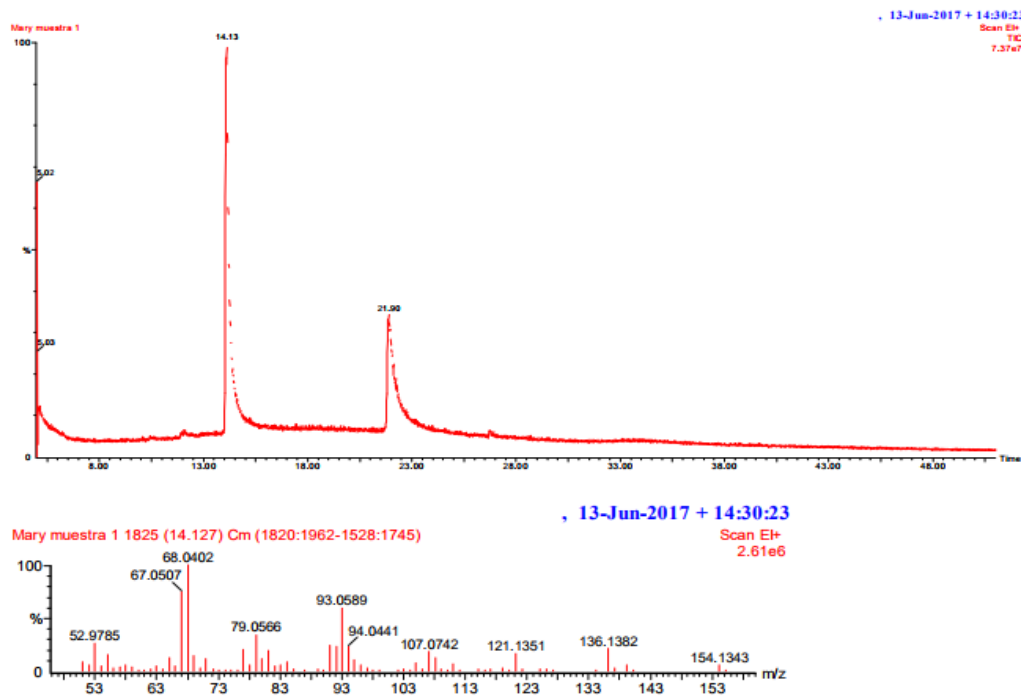


Figura 32. Cromatograma del AE de *L. turbinata*.

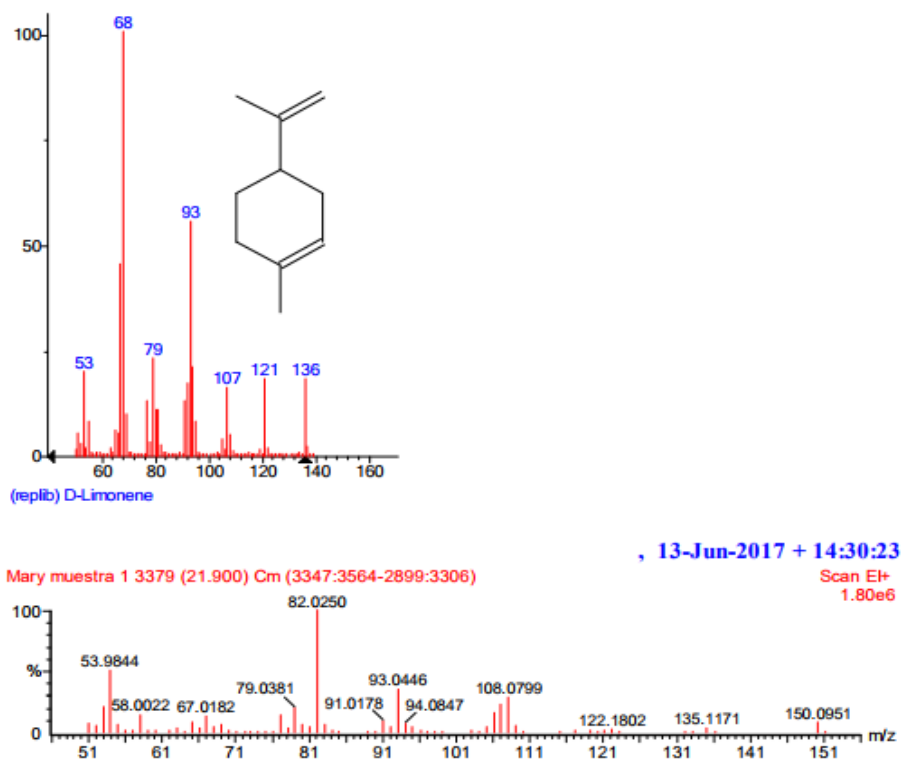


Figura 33. Patrón de fragmentación de D-Limoneno.

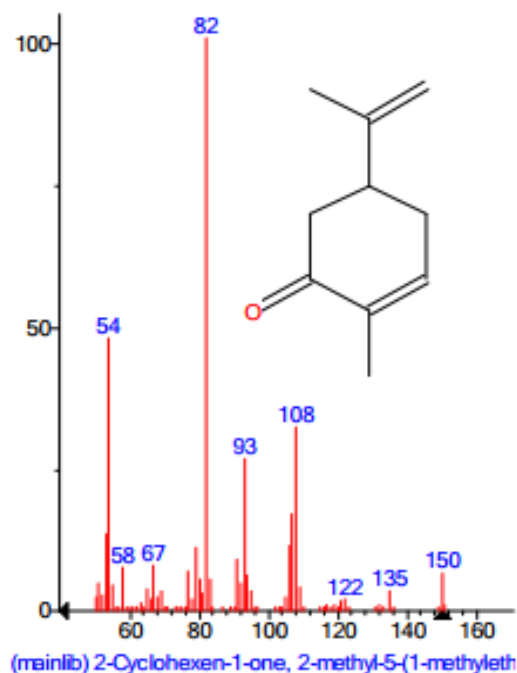


Figura 34. Patrón de fragmentación de carvona.

Por otro lado, el AE de *L. alba* es un ejemplo de las variaciones en la composición química de estas especies, por lo que presenta varios quimiotipos. Los componentes más comunes en estos aceites son: limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, alcanfor, linalol, α -pineno y timol. Otros metabolitos encontrados en estas especies son flavonoides, naftoquinonas, alcaloides, verbascosidos (Farfán Barrera, Oliva Hernández, & Jayes Reyes, 2012).

La especie *L. alba* estudiada en esta tesis presentó Z-citral (59,1 %), carveol (33,3 %), β -cariofileno (2,2 %) y α -muuroleno (2,2 %). El resto de los componentes minoritarios (2,7 %) no fueron identificados. En Argentina, *L. alba* presenta los quimiotipos linalool (hasta 91%), el quimiotipo citral (hasta 76% con dos subtipos, mirceno o limoneno), el quimiotipo piperitona (hasta 37%), el quimiotipo lippiona (hasta 50 %) y el quimiotipo dihidrocarvona (Ricciardi et al., 2009). En diferentes regiones de Colombia, se encontraron quimiotipos de citral, carvona (Agudelo-Gomez, Gómez Ríos, Durán García, Stashenko, & Betancur-Galvis, 2010) y limoneno, mientras que en Uruguay se identificó el quimiotipo linalool (Linde, Colauto, Albertó, & Gazmin, 2016). En especies de *L. alba* recolectadas en Brasil, los principales componentes fueron geranial (24,6 %) y carvenona (20,92 %) (Conde et al., 2011).

5. Resultados y discusión

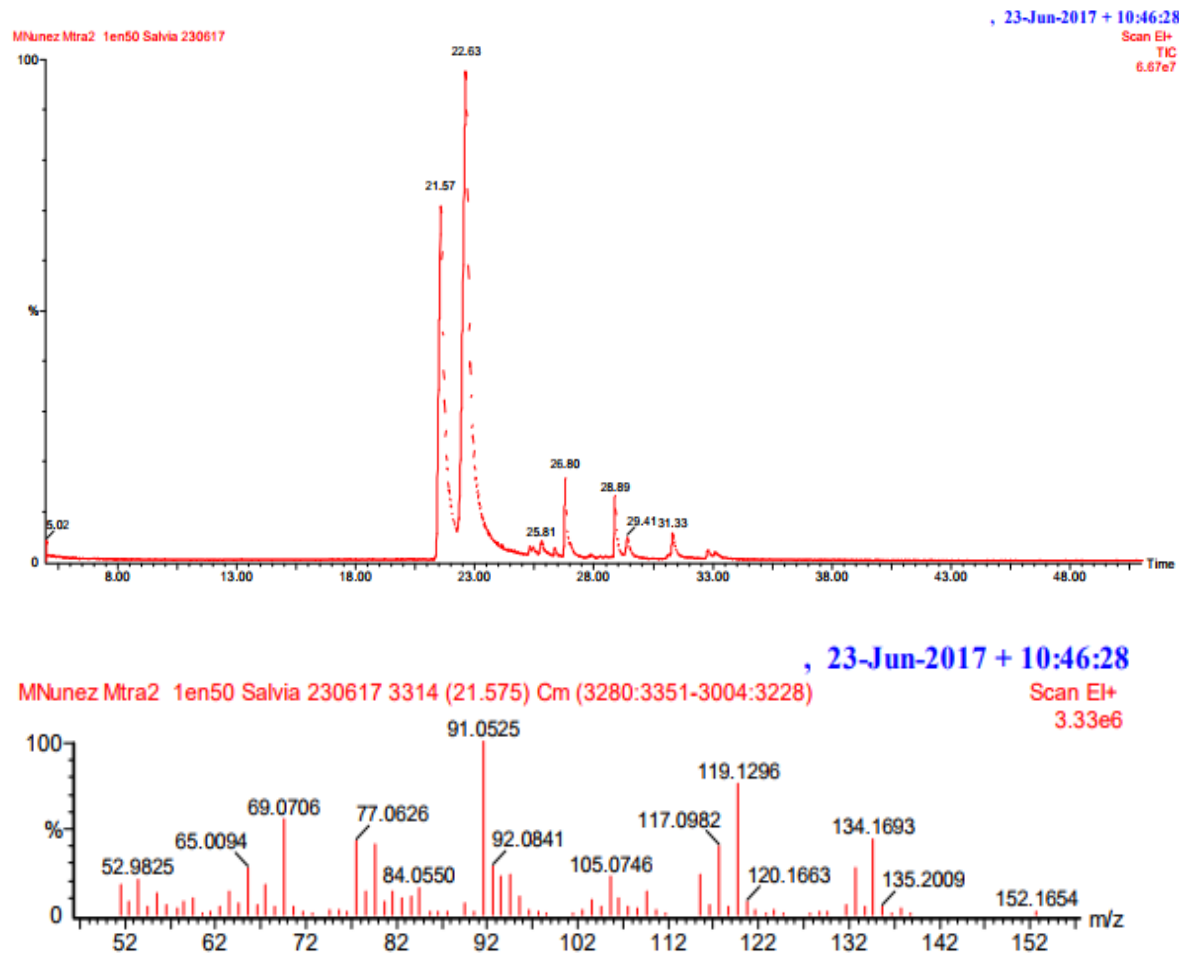


Figura 35. Cromatograma del AE de *L. alba*.

En la especie *L. alba* el compuesto mayoritario fue (Z)-citral³ (59,1 %; tiempo de retención 22,6 minutos), seguido por carveol (33,3 %, tiempo de retención 21,6 minutos) y en menor cantidad β -cariofileno (2,2 %, tiempo de retención 26,8 minutos) y α -muuroleno (2,2 %, tiempo de retención 28,8 minutos). El 2,7 % restante de los componente del AE no fueron identificados, este porcentaje implica la presencia de al menos 4 componentes cuyos tiempos de retención fueron 25,8, 29,4, 31,3 y 32,7 minutos. En la Figura 35 se muestra el cromatograma del AE de *L. turbinata* y en las figuras 36, 37, 38 y 39 se pueden apreciar los patrones de fragmentación obtenidos para los compuestos identificados.

³ Los isómeros neral y geranial no fueron identificados en este estudio.

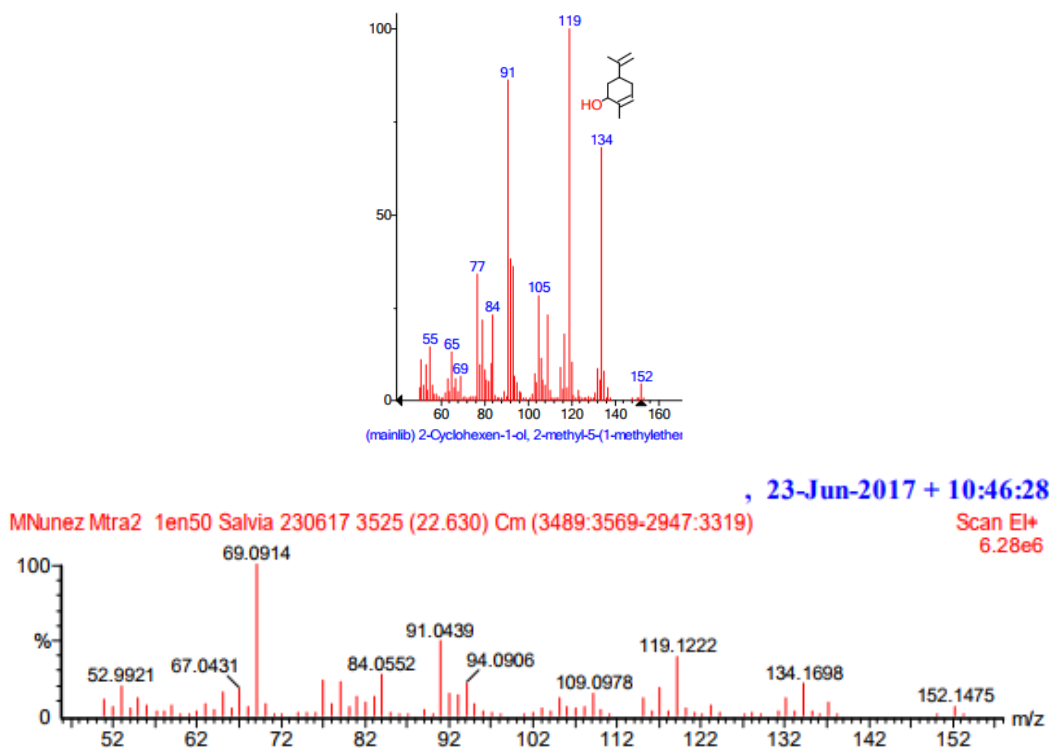


Figura 36. Patrón de fragmentación del carveol.

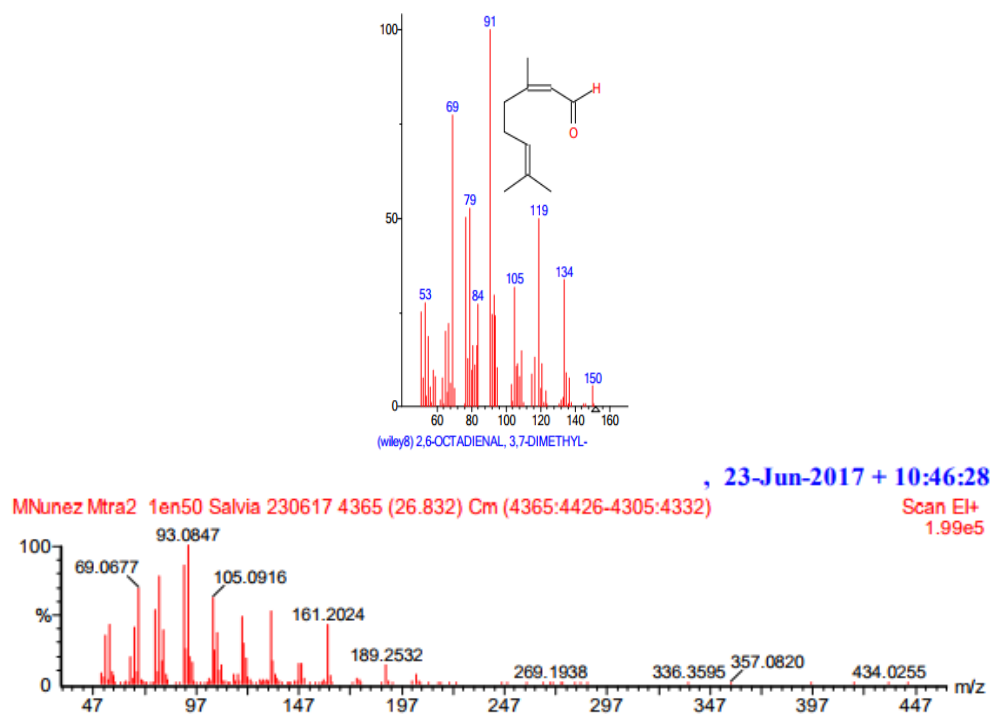


Figura 37. Patrón de fragmentación del citral.

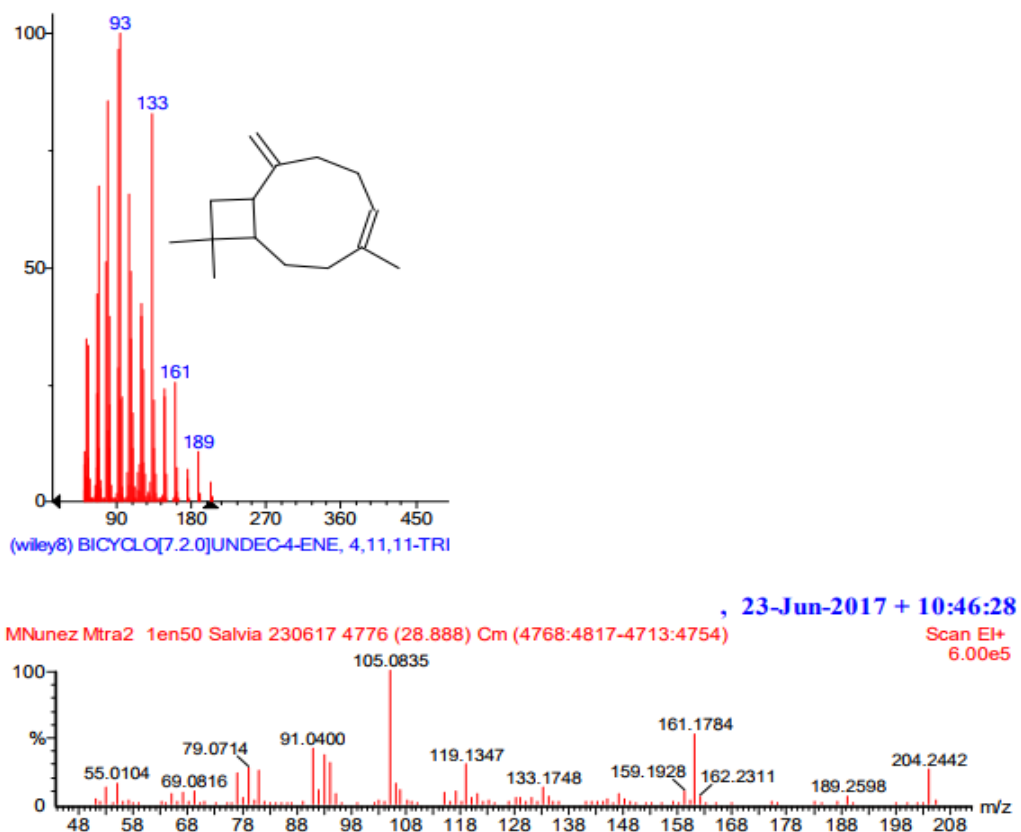


Figura 38. Patrón de fragmentación del β -cariofileno.

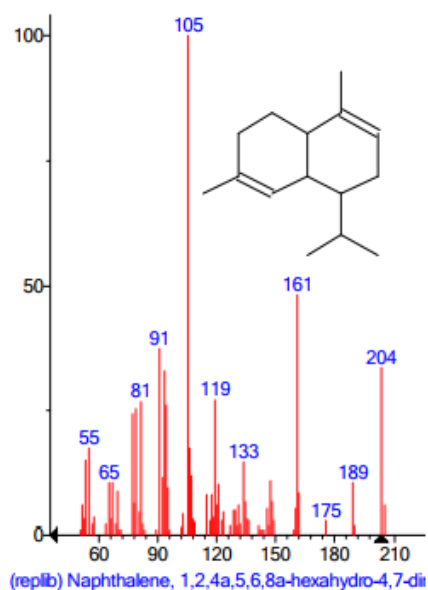


Figura 39. Patrón de fragmentación del γ -muuruleno

Esta diversidad química de *L. alba* está relacionada con los monoterpenos e hidrocarburos sesquiterpénicos. Los principales compuestos son los monoterpenos aromáticos como el timol, el

carvacrol, acetato de citronelol, p-cimeno, limoneno, linalol, mirceno, α y β -pineno, piperitona, sabineno, α -terpineol, alcanfor, (+) α -pineno, (-) piperitenona; y los sesquiterpenos: cariofileno; alcanos: metil-decil cetona, metil-octil cetona (PROSISA, 2005), y los hidrocarburos monoterpénicos y sus compuestos oxigenados tipo tuyona, pineno y careno, que están presentes en una menor proporción. Los sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (β -cariofileno, humuleno y germacreno) constituyen aproximadamente el 15% de los AE de *L. alba* (Vega-Vela, Delgado-Ávila, & Cacán-Sánchez, 2013).

Estos compuestos son en parte, responsables de la actividad biológica.

5.2 Caracterización de extractos vegetales

Los extractos obtenidos fueron fluidos con una densidad cercana a la del agua y un valor de pH cercano al neutro. El aroma y el color fueron diferentes para cada extracto. En general se puede decir que el sabor de ambos extractos es amargo, y la percepción de sabor mentolado en el extracto de *L. alba* (E-La) puede deberse a la presencia de limoneno. Como se puede apreciar en la Figura 40, el polvo húmedo de *L. turbinata* es marrón y el polvo húmedo de *L. alba* es verde oliva oscuro. En la Figura 41-A el extracto de *L. turbinata* (E-Lt) es marrón oscuro, mientras que el extracto E-La obtenido fue verde oliva. La diferencia de color se hace más evidente cuando se impregna un papel con cada extracto (figura 41-B).



Figura 40. Polvo de hojas de las especies vegetales luego del proceso de lixiviación.

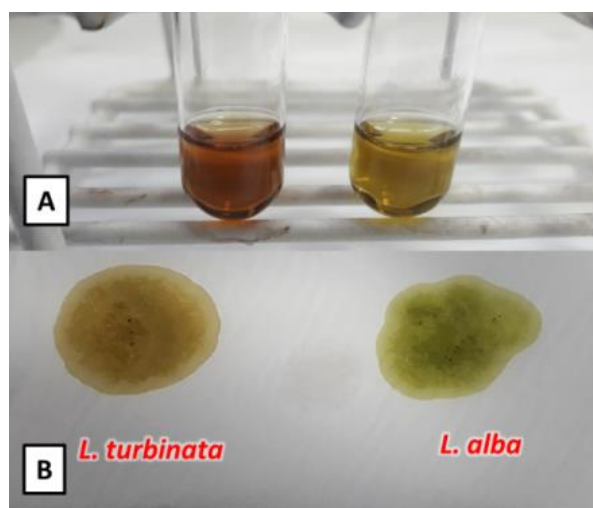


Figura 41. A) tubos con una dilución 1/10 de cada extracto en etanol 70. B) Papel absorbente impregnado con unas gotas de cada extracto vegetal recién obtenido.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se presentan en la tabla 12. En ambos extractos se obtuvo resultados positivos para la presencia de hidratos de carbono, dudoso para taninos, esteroides y triterpenos, y leucoantocianinas.

5. Resultados y discusión

Los estudios relacionados con la composición química de especies de *Lippia* se enfocan principalmente en los constituyentes volátiles. Una minoría de trabajos presenta estudios fitoquímicos sobre componentes no volátiles.

La caracterización fitoquímica cualitativa realizada para *Lippia turbinata* no ha sido concluyente, dando positivo para hidratos de carbono y saponinas, resultados dudosos para taninos, cardenólidos, esteroides y triterpenos. En otros trabajos se ha encontrado que *L. turbinata* también posee alcaloides, triterpenos y derivados de esteroides identificados como saponinas (Gomes, Nogueira, & Moraes, 2011).

Hernández, Tereschuk, & Abdala (2000) hallaron en el extracto metanólico de *L. turbinata* compuestos monohidroxilados en el anillo B, dos derivados 7-o-glicosilados y uno 3-o-glicosilado. Portmann et al. (2012) estudiaron la composición de la infusión y la decocción de *L. turbinata* y no detectaron taninos condensados. (Coll Aráoz & Abdala, 2005) hallaron presencia de flavonas y flavonoles en el extracto metanólico de esta especie, y determinaron por los valores de relación de frente en cromatografía y el viraje de color frente a distintos reactivos observados bajo luz UV, la presencia de flavonas 5-OH y 4'-OH sustituidas y flavonoles 3-OH sustituidos; ambos mono y diglicósidos en posición C7.

Tabla 12. Resultados del tamizaje fitoquímico.

Fracción	Compuesto analizado	<i>L. turbinata</i>	<i>L. alba</i>
Fracción A	Flavonoides	-	+
	Taninos	Dudoso	Dudoso
	Lípidos	-	-
	Hidratos de carbono	+	+
Fracción B	Esteroides y triterpenos	Dudoso	Dudoso
	Antraquinonas	-	+
Fracción C	Alcaloides	-	-
	Cardenólidos	Dudoso	Dudoso
	Esteroides	-	-
	Leucoantocianinas	Dudoso	Dudoso
<i>Reacciones directas</i>			
	Saponinas	+	+
	Glicósidos cianogenéticos	-	-
	Antraquinonas y derivados	-	-
	Proteínas y amino grupos	-	-

Referencias: +: presencia; -: ausencia.

Aunque con el *screening* fitoquímico no se pudo determinar presencia de flavonoides, este grupo químico se ha reportado en esta especie, como se muestra en los párrafos anteriores.

No se han hallado datos sobre el rendimiento de extractos o contenido de polifenoles en E-Lt.

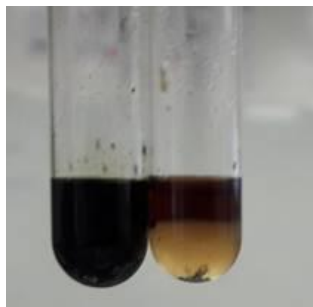


Figura 42. Tubos de hemólisis después de la Reacción de Shinoda (izquierda: E-Lt, derecha: E-La). Resultado negativo y positivo, respectivamente.

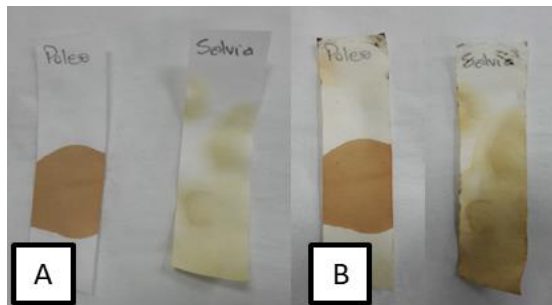


Figura 43. Papeles de filtro impregnados con E-Lt y E-La, antes (A) y Después (B) de ser sometidos a vapores de yodo. Resultado negativo.



Figura 44. Tubos con Fracción B de los E-Lt y E-La después de la reacción de Lieberman-Burchard. Resultado negativo.



Figura 45. Tubos con fracción C de los E-Lt y E-La después de la determinación de alcaloides. Resultado negativo.



Figura 46. Tubos con fracción C de los E-Lt y E-La después de la reacción para determinar leucoantocianinas. Resultado dudoso.

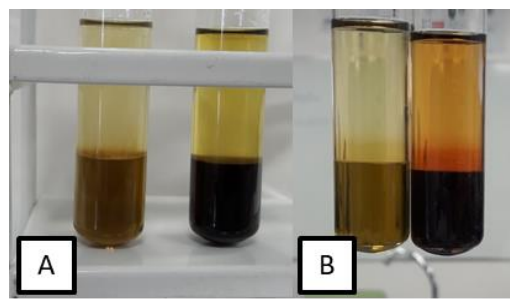


Figura 47. Tubos con fracción C de los E-Lt y E-La para determinar presencia de leucoantocianinas, inmediatamente después de realizar la mezcla (A) y luego de dejar reposar unos minutos (B).

5. Resultados y discusión

Con respecto al extracto etanólico de *L. alba*, los resultados fueron similares a los de *L. turbinata*, pero además mostraron resultados positivos para la presencia de flavonoides y antraquinonas. Al contrastar con bibliografía se pudo observar que en esta especie se hallaron taninos, triterpenos y derivados de esteroides identificados como saponinas (Gomes, Nogueira, & Moraes 2011).

La mayoría de los flavonoides identificados en el género *Lippia* son flavonas, siendo las más frecuentes las 6-hidroxiflavonas, metoxiflavonas y algunos sulfatos de flavonas (mono y bisulfatos), siendo también frecuentes las naftoquinonas (Gomes, Nogueira, & Moraes 2011).

Los iridoides teviridisídeo y tevesídeo-Na fueron aislados de varias especies de este género incluyendo *L. alba*, en la cual también se hallaron genoposídeo-Na y mussaenosídeo. Barbosa, Lima, Braz-Filho, & Silveira (2006) aislaron el iridoide sanzshida de la decocción de hojas de *L. alba*, y Sena Filho et al. (2007) aislaron teviridosídeo, mussaenosídeo y gardosídeo de la misma especie (Gomes, Nogueira, & Moraes, 2011).

Sette-de-Souza et al. (2014) han encontrado en la infusión de *L. alba* fuerte presencia de fenoles y alcaloides, y moderada presencia de flavonoides y trazas de saponinas y taninos. Además estudiaron la decocción de esta especie y encontraron fuerte presencia de fenoles, taninos, gomas, heterósidos alcaloides, resinas y moderada presencia de saponinas.

Extractos etanólicos y acuosos de las hojas registraron presencia de flavonoides glicosídicos y derivados fenilpropanoides como principales constituyentes. También se registraron saponinas en las hojas, pero no taninos (Dias Costa, Aguiar, & do Nascimento, 2004).

El rendimiento promedio de E-La en este estudio fue de 8,75 % (p/p), más del doble del informado en el estudio de Aguiar, Costa, Nascimento, & Sena (2008), donde el extracto etanólico de hojas de *L. alba* rindió 3,48 %.

Tabla 13. Características organolépticas y parámetros físicos evaluados en los extractos hidroalcohólicos.

Especie	Color	Olor	Sabor	Contenido fenólico (µg EAG/ml)	Rendimiento peso seco (%)	Densidad (g/ml)	pH
<i>Lippia turbinata</i> Griseb	Marrón oscuro	<i>Siu géneris</i>	Amargo	5605,0 ± 414	7,97 ± 0,04	0,913	6,60 ± 0,33
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	Verde oscuro	Alimonado	Amargo mentolado	6391,6 ± 160	8,75 ± 0,19	0,922	6,79 ± 0,22

Tanto el rendimiento como el contenido de compuestos fenólicos fueron mayores en E-La que en E-Lt de este estudio. Esto puede deberse a la naturaleza química de los fitocompuestos y a su afinidad por el solvente de extracción.

Núñez et al. (2012) encontraron el siguiente contenido de compuesto fenólico en diferentes extracciones de *L. alba*: Infusión $2,226 \pm 0,078$, decocción $2,296 \pm 0,089$ y extracto etanólico $40,929 \pm 0,557$ mM EAG/L extracto (expresados como milimoles equivalentes de ácido gálico por litro de extracto).

La especie *L. alba* ha sido más ampliamente estudiada en comparación con *L. turbinata*. Se puede apreciar en la bibliografía analizada una gran variación en el tipo de metabolitos hallados en los distintos extractos. Esto puede deberse, al igual como ocurre con los AE, a las condiciones en las cuales se desarrolla la planta, que puede afectar o estimular la producción de un metabolito en lugar de otro. Otro factor que puede afectar es el método y el solvente empleado para obtener los extractos. A pesar de las diferencias halladas, se puede apreciar que los grupos de metabolitos que están frecuentemente presentes son saponinas y flavonoides. Estos grupos de fitoquímicos tienen reconocida actividad antibacteriana y antiinflamatoria.

5.3 Actividad antimicrobiana *in vitro*

Los extractos presentaron actividad frente a las cepas Gram positivas, pero no frente a las Gram negativas y levaduras evaluadas.

Los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos solos y combinados, frente a las cepas Gram positivas se presentan en la tabla 14. Los extractos solos presentaron valores de CIM entre 125 y 500 µg EAG/ml. Pero, al combinarse, la CIM de E-Lt disminuyó a la mitad frente a *S. aureus* y hasta un 25% del valor inicial frente a *S. epidermis*. Mientras que el E-La también redujo su CIM a la mitad frente a *S. aureus*, y *S. epidermidis*. Frente a *E. faecalis* los extractos no presentaron actividad en el rango ensayado, pero fue interesante observar que sí fueran activos cuando se probaron combinados.

Del índice combinatorio fraccionario se desprende que los extractos no presentan interacción antagónica, por lo que pueden ser empleados en conjunto, sin que se anule o disminuya la acción antibacteriana que presenta esa combinación.

Hasta el momento no se han encontrado trabajos donde se estudie la CIM de extractos de *L. turbinata*, en cambio, sí se han encontrado algunos trabajos donde se evaluó la actividad antibacteriana de esta especie empleando la técnica de difusión en discos. Esto hace que sea dificultoso la comparación de resultados. Por otro lado, *L. alba* ha sido ampliamente estudiada, donde se ha encontrado mayor cantidad de información sobre su actividad antibacteriana.

5. Resultados y discusión

Tabla 14. Concentración inhibitoria mínima de los extractos solos y combinados entre ellos, y expresión de la interacción.

Cepa	CIM (µg EAG/ml) <i>L. turbinata</i>	CIM (µg EAG/ml) <i>L. alba</i>	CIM <i>L. Turbinata</i> / CIM <i>L.alba</i> (µg EAG/ml)	Índice Fraccionario	Tipo de interacción
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	500	500	250/250	1	Aditiva
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	250	125	62,5/62,5	0,5	Aditiva
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	NA	NA	31,2/31,2	0,06	Sinérgica

NA: no activo

Según Pessini et al. (2003) y Holetz et al. (2002) el extracto etanólico de *L. alba* tiene una CIM mayor a 1000 µg/ml frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Paeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Esto es muy superior a lo hallado en este estudio, pero como se mencionó anteriormente, la actividad de las especies se ven afectadas por la expresión de sus metabolitos secundarios, lo cual depende de muchos factores. También Nuñez et al. (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de esta especie y sólo la decocción y el extracto etanólico fueron activos, siendo este último el más activo, con valores de CIM entre 125 y 800 µg EAG/ml y su concentración bactericida mínima (CBM) de 250 y >1000 µg EAG/ml, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas.

Haag et al. (2014) encontraron que el extracto obtenido con diclorometano y metanol de *L. alba* inhibe el crecimiento de *S. aureus* pero no de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sette-de-Souza et al. (2014) hallaron que tanto la infusión y decocción de *L. alba* presentaron fuerte inhibición bacteriana frente a *S. mutans* ATCC 25175, *S. mitis* ATCC 903, *S. aureus* ATCC 25923 y *Lactobacillus casei* ATCC 9595. En el estudio llevado a cabo por Aguiar et al. (2008), *L. alba* inhibió a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* en una concentración de 2000 µg/disco, con un halo mayor a 10 cm, considerado como significativo. Además, un estudio realizado a partir del extracto etanólico, obtenido por maceración (1 % p/v) mostró actividad citotóxica significativa frente a las líneas celulares NCI-H292 y HEP-2, siendo éstas últimas las más sensibles, demostrando cierta actividad antitumoral (Dias Costa et al., 2004).

Además del reconocido uso en medicina folklórica, estos resultados avalan el uso de las especies como antimicrobianas, presentando mayor capacidad de acción sobre cepas Gram positivas. Lo cual es de esperarse por las características estructurales más simples de este grupo bacteriano.

Estos resultados fueron claves para decidir la combinación de extractos a incorporar en las formulaciones farmacéuticas a desarrollar. Se tomó como criterio incluir una concentración de al

menos 4 veces la concentración inhibitoria de la combinación. Es decir, que por 1 gramo de formulación se incluirá al menos 2000 µg EAG (1000 µg EAG provenientes del E-Lt y 1000 µg EAG provenientes del E-La). Esto representa el uso de 3 g de la combinación de extractos, expresadas en peso seco por cada 100 g de formulación.

5.4 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Siempre que exista una infección en algún tejido, se acompaña de un proceso inflamatorio, por lo que es apropiado conocer el efecto antiinflamatorio de los extractos individualmente y al combinarlos en la proporción antes mencionada.

Para medir el efecto antiinflamatorio se empleó como sustancia de referencia, una solución de indometacina. El parámetro de comparación en este ensayo fue la concentración que inhibe el 50% (CI_{50}) de la peroxidación lipídica generada por la lipoxigenasa de soja.

En la tabla 15 se puede observar que la cantidad de extracto que se necesita para inhibir el 50% del proceso de peroxidación es similar en ambas especies cuando se emplean individualmente, pero disminuye el valor de CI_{50} a menos de la mitad cuando se emplean combinados. Aunque la cantidad de indometacina necesaria para producir el mismo efecto sea inferior, el valor de CI_{50} de la combinación de extractos se aproxima a la sustancia de referencia y evidencia una interacción sinérgica respecto a la actividad antiinflamatoria.

Tabla 15. Parámetros calculados para la actividad antiinflamatoria.

Extracto	Ecuación del gráfico	R^2	CI_{50} (µg)
<i>L. turbinata</i>	$y = 1,6050x + 6,1979$	0,9717	24,95
<i>L. alba</i>	$y = 1,2855x + 14,095$	0,9606	24
Combinación	$y = 0,8377x + 48,823$	0,9679	10,86
Indometacina	$y = 4,9047x + 20,067$	0,9878	6,10

La acción antiinflamatoria de los extractos vegetales en general, se asocia a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, antocianidinas, antocianinas, entre otros. Los efectos antiinflamatorios se atribuyen a su capacidad de inhibición de la reacción inflamatoria en sus diferentes etapas (Cai, Sun, & Corke, 2004; Nagasaka et al., 2007; K. Patel, Jain, & Patel, 2013). La evidencia creciente muestra que el estrés oxidativo que se genera a través de radicales libres juega un papel importante en procesos inflamatorios; y los antioxidantes y los secuestradores

de radicales libres desempeñan un papel crucial en la atenuación de la inflamación. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en la señalización celular, desempeñando una función esencial de transducción. En las enfermedades inflamatorias, se producen y acumulan altos niveles de ROS. Los compuestos de tipo polifenol tienen un rol antioxidante importante, lo que contribuiría a inhibir la inflamación. Muchas investigaciones correlacionan el contenido de compuestos fenólicos con la actividad antiinflamatoria de extractos vegetales. (Perera, Samarasekera, Handunnetti, & Weerasena, 2016) han hallado una correlación negativa entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad inhibitoria *in vitro* de la lipoxigenasa, lo que significa que a mayor contenido de fenoles, menor valor de CI_{50} , y por lo tanto el extracto es más activo. Esto también ha sido observado por otros autores (Frum & Viljoen, 2006; Kamatou, Viljoen, & Steenkamp, 2010; Paun et al., 2018; Wangensteen, Samuelsen, & Malterud, 2004) en estudios que respaldan el hecho de que la mayoría de los inhibidores de LOX pertenecen a la clase de compuestos fenólicos. Por otro lado, se considera que los flavonoides son los inhibidores fenólicos más potentes de esta enzima.

En el *screening* fitoquímico, los extractos estudiados presentaron resultados positivos para la presencia de flavonoides, hidratos de carbono, antraquinonas y saponinas, de los cuales los flavonoides y saponinas tienen, en diversos estudios, probada actividad antiinflamatoria. Por ejemplo, se investigaron los flavonoides en modelos de inflamación en ratas y se encontró que poseen una actividad significativa tanto en fase proliferativa y fase exudativa de la inflamación. Algunos flavonoides, como la quercetina, bloquearon las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa a concentraciones relativamente altas; mientras que a concentraciones más bajas, la ruta de la lipooxigenasa fue el objetivo principal de la actividad inhibitoria (Mohammed & Osman, 2014). También otros estudios informaron que las saponinas aisladas de aproximadamente 50 plantas tuvieron actividad antiinflamatoria contra varios modelos experimentales de inflamación en ratones y ratas (Mohammed & Osman, 2014).

Ezzat, Ezzat, Okba, Menze, & Abdel-Naim (2018) analizaron distintos extractos de *Zingiber officinale* y sus compuestos aislados, hallando que la acción del extracto acuoso fue mejor que la del diclofenac cuando fueron evaluados a igual concentración. De este extracto, extrajeron 8 compuestos purificados, donde solo 3 de ellos mostraron una potente actividad, aunque inferior a la del control. Se considera que los compuestos de los extractos en conjunto se complementan entre sí para dar una potencia mayor a la suma de cada uno de los componentes de las mezclas por separado (Pérez Azahuanche, Rodríguez Ávalos, León Marrow, & Malca García, 2010).

Esto demuestra que el aislamiento de un único compuesto o de un grupo de compuestos activos puede no ser tan efectivo incluso en dosis altas; inclusive podría tener potenciales efectos secundarios. Los intentos para aislar fitoquímicos puros individuales rara vez han mostrado un

comportamiento farmacocinético eficaz. Aunque se demostró que los fitoquímicos puros son altamente activos en el entorno *in vitro*, han fracasado en el tratamiento terapéutico *in vivo*, lo que llevó a una mayor investigación de varios mecanismos que contribuyen a la mejor eficacia (Yang et al., 2015).

Akula & Odhav (2008) estudiaron la actividad antiinflamatoria a los extractos de 18 especies, obteniendo valores de CI_{50} en el rango de 21,8 y 77,2 $\mu\text{g/ml}$, utilizando como referencia rutina y ácido nordihidroguayarático con valores de CI_{50} de 7,3 y 4,1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Costamagna et al. (2016) encontraron que el extracto de harina de fruta de chañar mostró un valor de CI_{50} de 48 $\mu\text{g/ml}$ y el naproxeno (inhibidor selectivo de LOX) un valor CI_{50} de 14 $\mu\text{g/ml}$. Dzoyem & Eloff (2014) hallaron valores de CI_{50} entre 37,25 y 62,99 $\mu\text{g/ml}$ para 12 extractos estudiados, empleando quercetina como control con un valor de IC_{50} de 35,85 $\mu\text{g/ml}$.

Independientemente de la especie vegetal que se estudie, es difícil que los extractos vegetales y sus metabolitos aislados presenten valores de inhibición comparables a los compuestos sintéticos empleados actualmente como antiinflamatorios. Pero es destacable, cuando se encuentran especies que presentan actividad que se aproxima a la de los compuestos sintéticos. No existe un criterio que pueda definir a partir de qué valor se puede considerar que un extracto presenta buena, moderada o pobre actividad inhibitoria de la LOX, pero basada en la bibliografía revisada, se puede decir que es difícil encontrar valores de CI_{50} inferiores a 20 $\mu\text{g/ml}$, por lo que resultados cercanos a este valor deberían considerarse representativos de una buena inhibición. Si los CI_{50} de productos vegetales llegaran a ser inferiores a este valor, tendría que considerarse que presenta muy buena actividad. De acuerdo a esta propuesta los extractos estudiados presentan buena actividad, la cual mejora de notablemente cuando los extractos son combinados, pues su valor de CI_{50} es muy inferior a 20 μg (10,86 μg). Estos resultados son alentadores ya que se podría aprovechar esta propiedad biológica de los extractos en formulaciones tópica que se puedan usar para procesos inflamatorios o infecciosos.

Características y evaluación de las formulaciones para uso en piel: hidrogeles y emulgeles

5.5 Resultados de las formulaciones de hidrogeles y emulgeles

5.5.1 Geles de Carbopol®

Para preparar los geles, primero se trabajó con Carbopol® 934 y Carbopol® 940. Se observó que al emplear 0,5 % (p/p) de polímero, las formulaciones no tomaron consistencia a pesar de elevar el pH por encima de 7, resultando productos fluidos. Al aumentar la concentración de polímero (1 y 1,5 % p/p), las formulaciones resultaron más consistentes. Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias a la vista y al tacto entre los geles preparados al 1 y 1,5 %, se decidió estudiar los geles al 0,5 y 1 % (p/p) para evaluar y conocer en qué medida los extractos afectan la estructura del gel.

Por otro lado, cuando empleamos glicerina como agente humectante, este le aportó una sensación levemente oleosa a la formulación, mientras que el agregado de propilenglicol dejó una sensación de piel humectada y no oleosa. Por esta razón, se decidió usar propilenglicol, evaluando 3 concentraciones (2,5, 5 y 10 % p/p). Un rol importante que cumple este excipiente, además de humectante, es el de actuar como cosolvente de los extractos. En este caso se seleccionó la concentración del 5 % p/p ya que no afectó la consistencia del gel, siendo suficiente para ayudar a la disolución de los extractos secos sin provocar sensación de oleosidad.

Finalmente, la solución de etanol de 70° se empleó también como cosolvente de los extractos. Para evitar que la aplicación de este componente genere una deshidratación de la piel, se empleó la mínima cantidad necesaria para lograr disolver el extracto.



Figura 48. Gel de Carbopol® 940 al 1% p/p.

Teniendo en cuenta la capacidad de inclusión de la mezcla de extractos y el aspecto general agradable fueron seleccionados los geles de Carbopol® cuya composición se indica en la tabla 16 (F1-4). Estas formulaciones fueron presentadas anteriormente en las tablas 3 y 4, pero en esta sección, las mismas fueron renombradas para una mejor comprensión.

Los geles de Carbopol® fueron los primeros en elaborarse en este trabajo experimental. A continuación se decidió trabajar con las mismas concentraciones de propilenglicol y etanol 70°, pero se emplearon otros gelificantes para observar si se mejoraba alguna propiedad evaluada.

5.5.2 Geles con derivados de celulosas

Las formulaciones preparadas con hidroxipropilmetilcelulosa y hidroxietilcelulosa resultaron muy adhesivas al tacto y pegajosas, dejando una sensación poco agradable en la piel al aplicarlas. Por este motivo no se continuó con el estudio de las mismas.

Los geles de CMC 10.000 resultaron muy firmes, presentando dificultad para su aplicación sobre la piel, por lo cual se decidió no continuar con su estudio.

Las formulaciones con metilcelulosa formaron geles moderadamente firmes, siendo más blandos a menor concentración. En las formulaciones con CMC 4.000 los resultados fueron similares.

Al comparar entre sí los distintos geles elaborados con derivados de celulosa, se observó que todos los geles incorporaron el extracto, con apariencia homogénea, sin observarse de aspecto, color u olor, ni separación de fases o exudado en al menos 30 días. Teniendo en cuenta lo mencionado, se seleccionaron las formulaciones F5 a F8 indicada en la Tabla 16. Composición porcentual (p/p) de las formulaciones de geles seleccionadas para realizar el seguimiento en el tiempo..

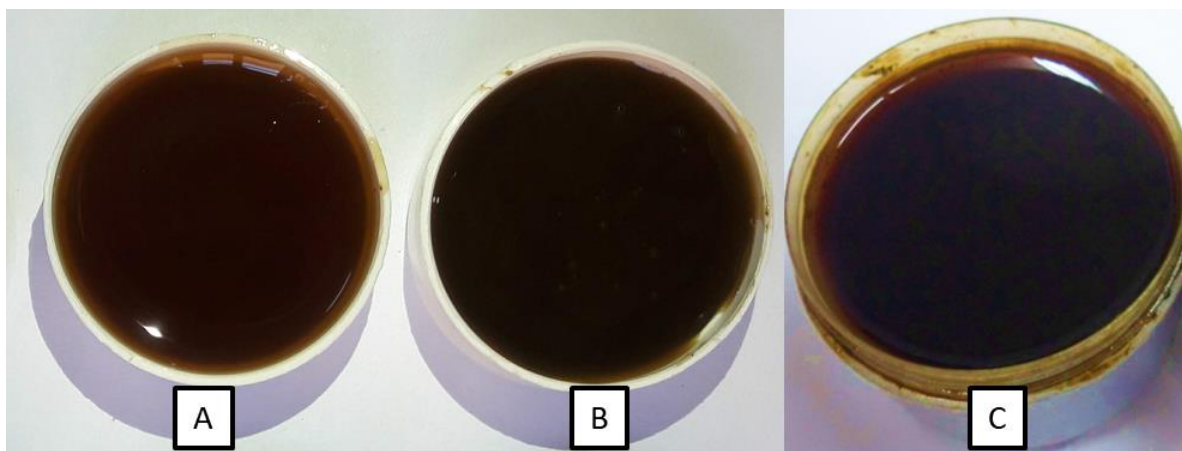


Figura 49. Geles con MC al 3% (A), al 4% (B) y con CMC al 4% (C).

5.5.3 Geles con Sepigel®

Todas las formulaciones preparadas con Sepigel® lograron incorporar los extractos y presentar un aspecto homogéneo. Al emplear Sepigel® al 2% (p/p), la formulación resultó ser muy fluida, con aspecto de solución líquida homogénea y color verde oscuro casi negro. Al aumentar la concentración de polímero se lograron geles viscosos, cuya consistencia aumentó al incrementar la concentración del polímero. El Sepigel® es una mezcla de polímero y tensioactivo, lo cual facilitaría la inclusión de sustancias no hidrosolubles. Con bajas concentraciones de polímero, el color de los emulgeles fue verde oliva intenso, pasando a verde oliva claro con altas concentraciones de polímero.

Se seleccionaron las formulaciones F9 a F11 (Tabla 16) para su caracterización y evaluación.

Tabla 16. Composición porcentual (p/p) de las formulaciones de geles seleccionadas para realizar el seguimiento en el tiempo.

Componentes	Formulaciones										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Carbopol® 934	0,5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbopol® 940	-	-	0,5	1	-	-	-	-	-	-	-
Metilcelulosa	-	-	-	-	3	4	-	-	-	-	-
Carboximetilcelulosa	-	-	-	-	-	-	3	4	-	-	-
Sepigel®	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6	8
Mezcla de extractos	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Propilenglicol	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Etanol 70°	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Trietanolamina*	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	-	-	-	-	-	-	-
Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	CS	c.s.

Referencia: TEA* se agregó hasta pH=7 o hasta que la formulación se tornó viscosa; c.s: cantidad suficiente.

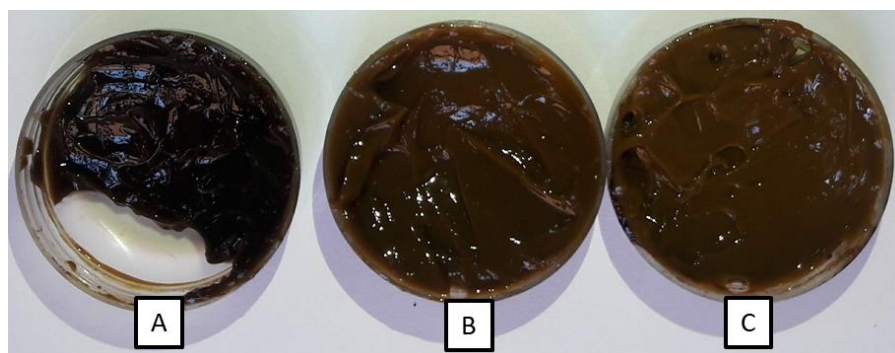


Figura 50. Geles con Sepigel® en las 3 concentraciones seleccionadas, 4% (A), 6% (B) y 6% (C).

5.5.4 Emulgeles

En las formulaciones de emulgeles, el valor de pH fue 4 antes del agregado de TEA, y 6,5 – 7 luego de su incorporación.

El extracto se incorporó con dificultad en las emulsiones preparadas. Trabajar con temperatura para fundir la fase oleosa hizo más difícil el proceso, dado que se trató de evitar exponer los extractos a elevadas temperaturas para conservar su integridad y actividad biológica.

Cuando se prepararon las emulsiones incorporando el polímero gelificante en la fase acuosa y luego se mezcló con la fase oleosa, así como cuando se preparó primero la emulsión y luego se mezcló con el hidrogel, todas las formulaciones presentaron un color verde oliva más claro que los geles, y con pequeños puntos blancos en todo el producto. Al cambiar la metodología de preparación, agregando el polímero gelificante a la emulsión preparada, no se observaron los puntos blancos pero sí distintas intensidades de verde en sectores del producto formulado, finalmente al cabo de 10 días hubo separación de fases.

Cuando se usó Carbopol® como viscosante de los emulgeles, se observó la presencia de grumos, a diferencia de las formulaciones preparadas con Pemulen®, con el cual se consiguió un producto de sensación más suave al tacto y oleoso. Cuando se empleó carboximetilcelulosa se observaron distintas intensidades de verde en el producto, probablemente debido a una falta de homogenización del extracto en la formulación.

En general, todos los emulgeles presentaron consistencia elevada y resultaron inestables en cuanto a la homogeneidad en el lapso de 30 días. Por esta razón ninguna formulación de emulgel fue seleccionada para su posterior evaluación a largo plazo.

5.6 Evaluación de las formulaciones de hidrogeles seleccionados

Caracteres organolépticos

Las formulaciones seleccionadas (Tabla 166) presentaron un color verde oliva pardo con distintas intensidades. Todos los geles adquirieron el olor de los extractos, intenso, propio de las especies, con una leve sensación de aroma mentolado, probablemente por la presencia de citral en *L. alba*. Presentaron aspecto homogéneo a simple vista, pero heterogéneos cuando se observaron bajo lupa binocular y microscopio. La consistencia varió según el tipo y concentración de polímero empleado. Esto último también influyó en la sensación al tacto de cada formulación, siendo más densas y pegajosas las de MC y CMC, mientras que las de Carbopol® resultaron livianas y con sensación refrescante. Las formulaciones con Sepigel® resultaron más livianas aún.

5. Resultados y discusión

Los geles elaborados tanto con Carbopol® como con MC y CMC resultaron opacos, característica que se contradice con la mayoría de los estudios publicados, donde los geles elaborados con estos excipientes adoptan el color del extracto pero resultan translúcidos (Agrawal, Baajpaye, y Singh 2012; Gawai et al. 2016; Haque et al. 2014). Los geles base tanto de Carbopol® como de los que emplean derivados de celulosa fueron translúcidos e incoloros.

El color de las formulaciones de Sepigel® es un tono más claro del que presentan los geles de Carbopol® y los de MC y CMC, debido a que los polímeros empleados le aportan un tono blanquecino a la mezcla, que al incorporar el extracto, hace que el verde oliva se aclare. A medida que aumenta la concentración de Sepigel®, el tono se hace aún más claro. Todas las formulaciones con Sepigel® son opacas, incluyendo sus bases, las cuales son blanquecinas. Los geles bases son inodoros.

pH y conductividad

En la preparación, el pH de la dispersión de Carbopol® fue 3 y no se modificó cuando se incluyeron los extractos.

Las formulaciones de Carbopol® al 0,5 % no se tornaron viscosas a pesar de la adición de TEA hasta un valor de pH neutro (7,6), por lo que se considera que no hubo gelificación; mientras que las formulaciones base gelificaron a un valor de pH inferior a 6. Los geles de Carbopol® al 1 % gelificaron a valores de pH entre 4,8 y 5,9, mientras que sus bases gelificaron a valores de pH más bajo (4,5 y 5,2).

La metilcelulosa y la carboximetilcelulosa no dependen del pH para formar geles. Los geles con MC y CMC, tanto aquellos que contienen extractos como sus formulaciones base, tienen valores de pH similares, la inclusión de la combinación de extractos no modificó los valores de pH. En los geles preparados con MC el valor de pH fue 6,9 antes de agregar los extractos, y su variación fue mínima (pH = 6,8 - 5,8) después del agregado de los extractos. En todos los geles de CMC, el valor de pH fue 6,9.

En los geles preparados con Sepigel®, la adición de los extractos produjo una disminución en los valores de pH respecto a las formulaciones base (pH = 6,9), alcanzando valores entre 5,5 y 6,5.

Todas las formulaciones se encuentran en un rango de valores de pH óptimo para la piel (5-7), debido a que esta posee un pH levemente ácido (Palomino-Yamamoto, 2001).

En trabajos donde se emplea Carbopol® 934 y CMC para la elaboración de geles con extractos vegetales, también se obtuvieron valores de pH cercanos a la neutralidad (pH 6,4-6,9) (Agrawal et al., 2012; Amit et al., 2013; Aruna et al., 2014; Chaurasiya & Chakraborty, 2014; Gaikwad &

Banerjee, 2013; Jadhav, Talele Swati, Bakliwal Akshada, & Chaudhari, 2015; Jyothi & Koland, 2016; Pattnaik et al., 2014) y cuando el extracto presentó valores de pH ácido, geles de Carbopol® gelificaron a un valor de pH inferior a 6.

Por otro lado, la medición de la conductividad es una manera rápida y sencilla de determinar la fuerza iónica de una solución. La fuerza iónica es un factor que afecta la estabilidad de las emulsiones y puede afectar a los gelificantes iónicos.

En nuestro caso, la conductividad varió ampliamente de una formulación a otra. De manera general, la inclusión del extracto modificó la conductividad de los geles. La conductividad también se vio afectada cuando se aumentó la concentración del agente gelificante, excepto en las formulaciones que contienen CMC (F7 y F8).

En las formulaciones con Carbopol® y MC la conductividad aumentó entre 4 y 7 veces, respecto a los geles base. En cambio, las formulaciones con CMC (F7 y F8) fueron las menos afectadas, aumentando su conductividad en promedio 1,2 veces respecto de sus bases. En las formulaciones con Sepigel® se observó que la conductividad aumentó entre 1,4 y 1,9 veces respecto de sus bases, y que cuando se empleó mayor concentración de polímero, se afectó menos.

El aumento de la conductividad al aumentar la concentración de polímero ionizado en las formulaciones de Carbopol® y Sepigel® se considera lógico, porque aumentan los iones presentes en solución, pero esto no ocurre en las formulaciones F3 y F4. Tal vez podría relacionarse a que el pH de F4 fue más bajo que en F2, por lo que los grupos carboxilos no se encontrarían completamente ionizados, a pesar de que la solución se tornó viscosa a ese valor de pH.

Los geles con Sepigel® no necesitan ser neutralizados para tornarse viscoso pero sí se ven afectados por electrolitos de la misma forma en que se afectan los polímeros de Carbopol®. En los geles base se vio que a pesar de que las tres formulaciones (F9-F11) presentaron el mismo valor de pH, hubo un aumento en la conductividad al aumentar la concentración del polímero. Al incluir el extracto, el pH disminuye en las formulaciones de Sepigel® con mayor concentración (F10 y F11), pero su conductividad es mayor, y esta variación se relaciona con la naturaleza del polímero.

Las formulaciones preparadas con MC presentaron el menor valor de conductividad de todos los geles.

Las formulaciones de CMC son las que presentaron el mayor valor de conductividad y a su vez, las que menos se afectaron por el agregado de los extractos. Al igual que las formulaciones de MC, la conductividad aumenta con el aumento de polímero, a pesar de que el pH no varía.

Homogeneidad

Los geles de Carbopol® y de celulosas que incorporaron los extractos, resultaron ser sistemas heterogéneos, debido a que en estos se notó la presencia de “partículas” cuando se observan mediante lupa binocular y microscopio. Los geles de Carbopol® (F1, F2, F3 y F4) presentaron un amplio rango de tamaño de partículas, mientras que los elaborados con MC (F5 y F6) fueron los más uniformes. Los geles con CMC presentaron partículas de tamaño intermedio entre los geles antes mencionados, visiblemente similares a las partículas en geles de MC. Por otro lado, no se observaron partículas en los geles de Sepigel®. En las figuras 51 a 54 se muestran fotografías de los geles observados al microscopio.

Cuando se observaron los geles bases, ya sea con lupa binocular o microscopio óptico, no se observaron dos fases, esto indicaría que las partículas observadas son originadas por la presencia del extracto.

Tabla 17. Características físico-química evaluadas en los geles.

Formulación	Parámetros					
	Contenido de polifenoles (µg/g)	Tamaño de partícula (µm)	pH		Conductividad (µSm/cm)	
	Con extractos	Con extractos	Gel base	Con extractos	Gel base	Con extractos
F1	2990,9 ± 192	<5 – 295	5,9 ± 0	7,5 ± 0,1	660 ± 0	2727 ± 6
F2	3041,8 ± 95	25 – 104	5,2 ± 0	5,9 ± 0,1	730 ± 0	3053 ± 137
F3	3057,5 ± 176	<5 – 295	5,5 ± 0	7,6 ± 0,1	550 ± 0	2783 ± 6
F4	3306,6 ± 110	20 – 152	4,5 ± 0	4,8 ± 0,2	300 ± 0	2033 ± 6
F5	2704,5 ± 155	4,5 – 14,1	6,9 ± 0	5,8 ± 0,2	250 ± 0	1807 ± 21
F6	2834,5 ± 137	5,6 – 21,6	6,9 ± 0	6,8 ± 0,2	273 ± 0	1987 ± 71
F7	2660,5 ± 128	9 – 60	6,9 ± 0	6,9 ± 0,1	4880 ± 394*	5455 ± 185*
F8	2709,3 ± 133	23 – 40	6,9 ± 0	6,9 ± 0,2	6900 ± 100	9083 ± 21
F9	4237,5 ± 189	NP	6,9 ± 0,1	6,5 ± 0,2	1610,00 ± 0	3056,67 ± 0
F10	4206,4 ± 4	NP	6,9 ± 0,2	5,5 ± 0,2	2396,67 ± 0	3820 ± 0
F11	4011,5 ± 117	NP	6,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1	3103,33 ± 0	4356,67 ± 0

NP= no presenta partículas en suspensión. *No presentan diferencias significativas ($p < 0,05$, Prueba T)

Patil, Gadade, & Rathi (2015) estudiaron geles de Carbopol® 940 en distintas concentraciones, vehiculizando 9% de extracto, también hallaron partículas en suspensión cuando los observaron al microscopio, con un pH comprendido entre 4 y 5,6, cuya viscosidad osciló entre 1210 y 1504 cPs, dijeron que poseía una apariencia apreciable como homogénea y la extensibilidad fue menor

cuando se empleó mayor concentración de polímero. En otros estudios donde emplean Carbopol® 934 y CMC, informaron que los geles fueron homogéneos, coloreados por el extracto y con cierta claridad (Agrawal et al., 2012; Amit et al., 2013; Jadhav et al., 2015).

A partir de los parámetros obtenidos en la caracterización se hizo una segunda selección de las formulaciones, para continuar su estudio.

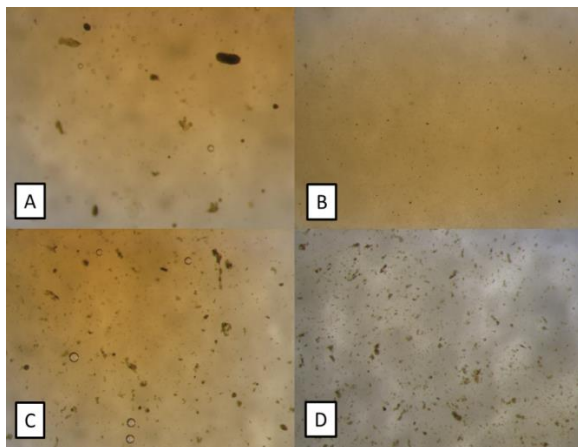


Figura 51. Fotografías de los geles de Carbopol® F1 (A), F2 (B), F3 (C) y F4 (D), observados con lupa binocular.

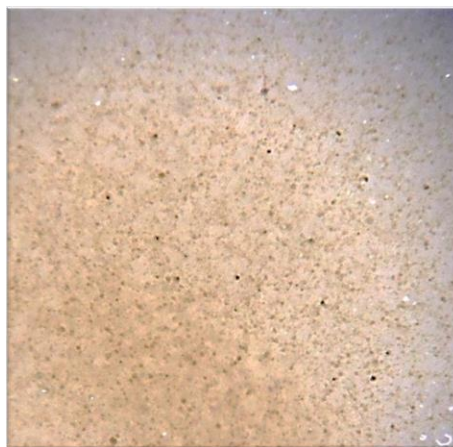


Figura 53. Fotografía de las partículas en suspensión en el gel F8 observadas con lupa binocular.

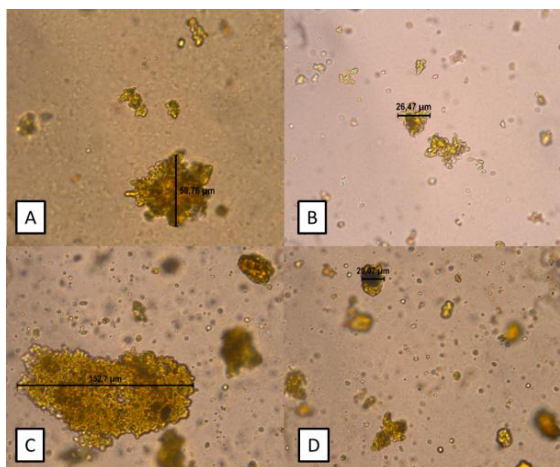


Figura 52. Fotografías de las partículas en suspensión presentes en las formulaciones F1 (A), F2 (B), F3 (C) y F4 (D) observadas con microscopio óptico.

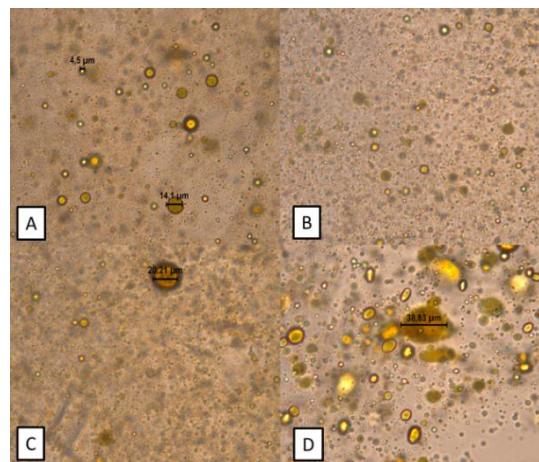


Figura 54. Fotografías de las partículas en suspensión presentes en las formulaciones F5 (A), F6 (B), F7 (C) y F8 (D) observadas con microscopio electrónico.

Las imágenes de F9 a F11 no se incluyeron debido a que solo presenta una fase continua sin presencia de partículas en suspensión.

Extensibilidad

En las figuras 55-60 se muestran los gráficos resultantes de la extensibilidad de los geles, donde se graficó el diámetro promedio de extensión (mm) en función del peso agregado durante 5 minutos.

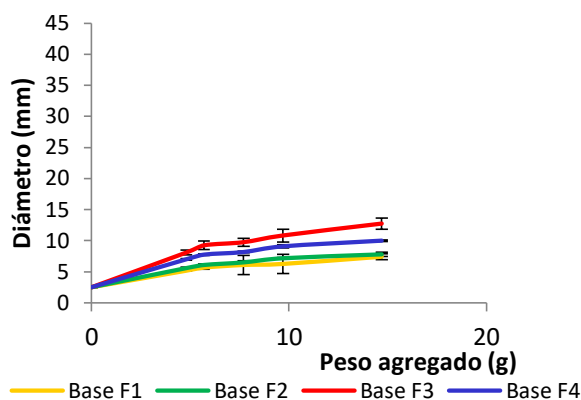


Figura 55. Extensibilidad de geles base de Carbopol®.

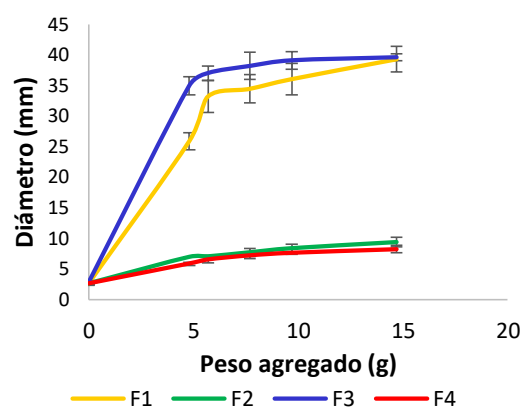


Figura 56. Extensibilidad de geles de Carbopol® con extractos.

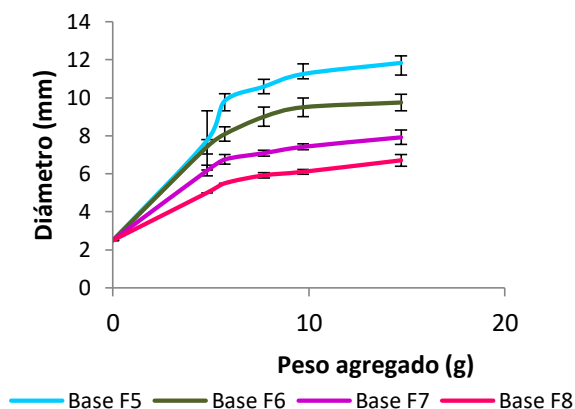


Figura 57. Extensibilidad de geles base de MC y CMC.

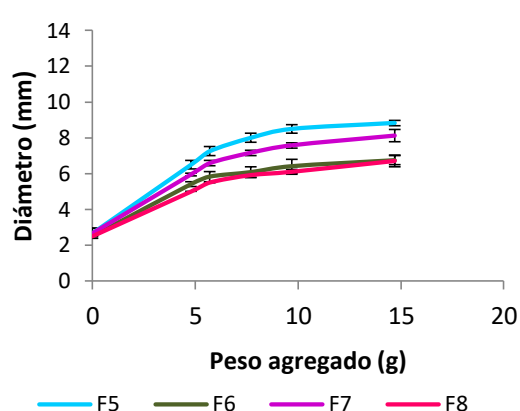


Figura 58. Extensibilidad de geles de MC y CMC con extractos.

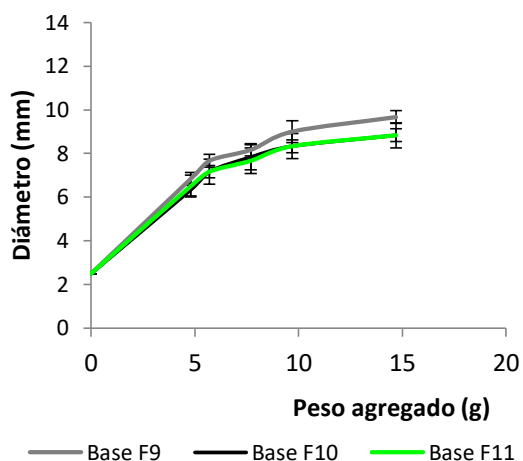


Figura 59. Extensibilidad de geles base de Sepigel®.

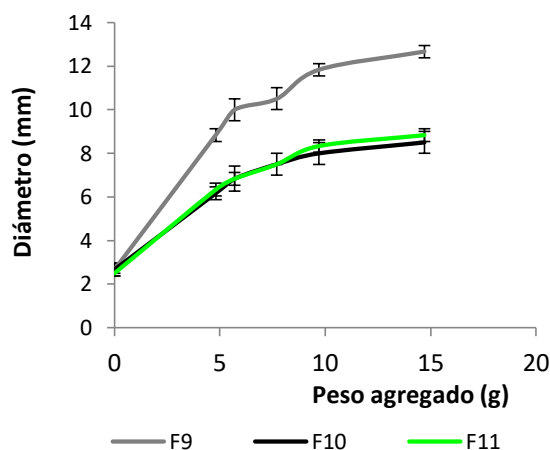


Figura 60. Extensibilidad de geles de Sepigel® con extractos.

Los geles preparados con Carbopol® al 0,5 % (F1 y F3) fueron los que presentaron mayor extensibilidad, seguidos de la formulación con Sepigel® al 4 % (F9). En general, los geles con Carbopol® y Sepigel® que vehiculizaron el extracto fueron más extensibles que sus bases. Los geles elaborados con MC y CMC (F5-8) presentan menos extensibilidad que sus respectivas bases. La menor extensibilidad de geles con MC y CMC puede deberse a la presencia de taninos y fenoles en los extractos, debido a una probable incompatibilidad con estos excipientes (Monografías Farmacéuticas, 2002; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2006), como se explica más adelante. De los geles con Sepigel®, F9 fue el que mostró un aumento de la extensibilidad por la inclusión del extracto, mientras que F10 y F11 no sufrieron modificaciones importantes por la inclusión del extracto.

Propiedades mecánicas de los geles

Los geles se caracterizaron respecto a su dureza y adhesividad, mostrando los valores en la tabla 18. Éstos parámetros se han determinado tanto en los geles con extractos como en sus bases, para evaluar cómo la presencia del extracto afecta a la estructura de gel y sus propiedades físicas.

Tanto la propiedad de dureza y como la propiedad de adhesividad variaron ampliamente según el polímero y concentración empleados. Los geles más blandos fueron los de Carbopol® y los más duros fueron los de MC y CMC al 4%.

En todos los geles de Carbopol® y Sepigel®, la inclusión del extracto produjo una disminución de la dureza y adhesividad. En los geles elaborados con derivados de celulosa tanto la dureza como

5. Resultados y discusión

adhesividad aumentaron, con excepción de la adhesividad para F5, la cual es similar tanto en el gel con extractos como en la base.

El polímero presente en el *blend* comercial Sepigel®, al igual que los polímeros de la marca Carbopol®, se ven afectados por la presencia de electrolitos o pH extremos, donde se observó que tanto la dureza como la adhesividad disminuyeron, siendo menos afectada la formulación cuando aumentó la concentración de polímero.

Las modificaciones en la textura son evidentes por los valores de dureza y adhesividad mostrados en la Tabla 18. Dureza y adhesividad para las formulaciones en gel seleccionadas. El cambio más drástico en la textura ocurre en los geles de Carbopol® al 0.5% (F1 y F3), que disminuye entre 5 y 6 veces la dureza respecto de la base, mientras que al 1% (F2 y F4) disminuyeron 3 veces el valor de dureza. Se observó que, cuando la concentración de Carbopol® es mayor, el sistema se ve menos afectado por la adición de los extractos. Esto se aprecia también en los geles con Sepigel®, donde la disminución de la dureza fue de 2,5 veces en la formulación F9, 1,3 veces en F10 y 1,1 veces en F11, respecto de sus bases.

La prueba estadística (prueba T) mostró que la inclusión del extracto produjo una modificación significativa ($p < 0,05$) de la dureza en las formulaciones, con la excepción de F5.

Tabla 18. Dureza y adhesividad para las formulaciones en gel seleccionadas.

Formulación	Parámetros			
	Dureza (g)		Adhesividad (mJ)	
	Gel con extracto	Gel base	Gel con extracto	Gel base
F1	13,50 ± 1,32	69,00 ± 6,77	0,14 ± 0,09	4,76 ± 0,56
F2	28,67 ± 5,39	102,00 ± 11,93	0,84 ± 0,49	4,22 ± 0,43
F3	13,83 ± 1,61	84,50 ± 10,99	0,15 ± 0,05	3,47 ± 0,45
F4	39,67 ± 1,76	112,50 ± 8,39	1,61 ± 0,15	4,00 ± 0,38
F5	77,50 ± 15,50*	59,00 ± 3,55*	3,82 ± 0,44♠	3,87 ± 0,77♠
F6	207,00 ± 45,51	47,00 ± 2,10	11,09 ± 3,27	2,25 ± 0,53
F7	85,33 ± 35,30	77,00 ± 7,54	4,40 ± 1,48♣	3,95 ± 0,38♣
F8	194,67 ± 11,72	141,00 ± 10,31	12,39 ± 3,16♦	7,46 ± 0,64♦
F9	36,83 ± 2,02	93,33 ± 0,29	2,03 ± 0,43	5,93 ± 0,54
F10	93,33 ± 4,25	119,50 ± 3,77	5,37 ± 0,44	7,18 ± 0,10
F11	128,00 ± 2,60	146,67 ± 3,88	7,52 ± 0,30	9,23 ± 0,46

Referencias: *, ♠, ♣, ♦ pares de datos que no presentan diferencias significativas en la prueba T.

La propiedad de adhesividad se justifica por las interacciones de tipo dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, entre las cadenas de polímero y entre éstas y la superficie de la sonda empleada en el texturómetro (Febriyenti et al., 2014). La variación de este parámetro con la inclusión del extracto se puede justificar por el incremento de la fuerza iónica, lo que inhibiría las interacciones iónicas, la asociación-disociación de enlaces de hidrógeno entre las macromoléculas de Carbopol® (Josef, Barat, Barsht, Zilberman, & Bianco-Peled, 2013), que hacen que el material sea adhesivo.

Se puede observar que los geles de Carbopol® 0,5% fueron los más afectados debido a que la adhesividad disminuye entre 23 y 34 veces respecto de la base, mientras que en geles al 1% la adhesividad disminuye entre 2,4 y 5 veces respecto de sus geles base. Estos geles también fueron los más afectados en la conductividad. Los geles de Sepigel® presentaron una razón de variación similar a la dureza respecto a sus geles base. Recordemos que estas formulaciones, habían aumentado su conductividad y disminuido el pH al incluir el extracto.

En las formulaciones que contienen MC y CMC (F5-F8), la inclusión de los extractos aumenta estas propiedades. En geles con MC la dureza, aumentó entre 1,5 y 4,4 en comparación con sus bases. La adhesividad prácticamente no se vio afectada en el gel al 3% pero aumentó 4,9 veces en el gel con 4% (F6). En geles con CMC, ambas propiedades se incrementaron levemente, tanto en aquellas al 3% (F5: 1,1 veces la dureza y la adhesividad) como al 4% (F6: 1,38 veces la dureza y 1,66 veces la adhesividad).

Cuando se empleó MC, la variación de adhesividad solo fue significativa en F6. Las formulaciones con CMC habían sido las menos afectadas en cuanto al pH y conductividad con la inclusión del extracto, y tampoco generó cambios significativos en la adhesividad.

De acuerdo con el *Handbook* de Excipientes Farmacéuticos (2006), las soluciones de carboximetilcelulosa sódica exhiben estabilidad a pH 7 – 9; y las soluciones de metilcelulosa se coagulan (efecto conocido como *salting-out*) con fenoles y taninos. Sin embargo, estos pueden evitarse mediante el agregado de etanol a 95° (Monografía Farmacéutica, 2002). Tal vez, los compuestos fenólicos de los extractos promuevan que estos geles se tornen más rígidos, pero la concentración no es suficiente para promover la coagulación.

De acuerdo con los resultados de la dureza, las formulaciones más duras tienen menos extensibilidad y las menos duras tienen una mayor extensibilidad.

Viscosidad y consistencia

Carbopol es un polímero derivado del ácido acrílico. A lo largo de la cadena presenta grupos ácidos, que al encontrarse en un medio neutro o levemente alcalino se ionizan, quedando cargas

5. Resultados y discusión

negativas que generan una repulsión electrostática entre los demás grupos carboxilos ionizados de la cadena, haciendo que la misma se estire y la solución en donde se encuentran se torne más viscosa. Para mantener esa consistencia viscosa depende de la fuerza iónica del medio (concentración de electrolitos) o pH, donde los pH extremos o elevadas concentraciones de electrolitos hacen que disminuya la viscosidad de estas soluciones. Este excipiente es incompatible con fenol, ácido fuerte y altos niveles de electrolitos (Rowe, Sheskey, & Owen, 2006).

Conociendo que los electrolitos alteran su capacidad de gelificación y que la inclusión del extracto disminuyó la viscosidad de los geles, podría relacionarse esto con que los extractos contengan especies ionizadas a pH neutro, como ácidos fenólicos o flavonoides (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002). Sus cargas interactuarían con los grupos ácidos cargados negativamente de Carbopol® e inhibirían la gelificación.

Los geles de MC y CMC se tornaron menos viscosos cuando se incluyeron los extractos (Tabla 19). La bibliografía (Monografías Farmacéuticas, 2002; Rowe, Sheskey, & Owen, 2006) indica que MC es incompatible con disoluciones ácidas y CMC coagulan con fenoles y taninos. La presencia de compuestos polifenólicos de origen vegetal podría ser la responsable de este cambio.

Los geles con Sepigel® también mostraron una disminución de la viscosidad al incorporar el extracto. Se pudo observar que el sistema se afectó menos al aumentar la concentración de polímero.

Tabla 19. Viscosidad de las formulaciones en gel.

Formulación	Viscosidad (mPa.s)	
	Gel base	Con extractos
F1	40000 ± 4000	No se puede medir
F2	82667 ± 4619	14000 ± 1000
F3	92667 ± 4163	9000 ± 1000
F4	140000 ± 4000	64000 ± 4000
F5	36000 ± 500	22417 ± 520
F6	112667 ± 3055	96667 ± 4163
F7	3200 ± 400	483 ± 76
F8	18333 ± 1041	3133 ± 306
F9	84667 ± 5033	17667 ± 289
F10	109000 ± 1000	76667 ± 577
F11	135667 ± 2082	111333 ± 1155

A partir del cambio generado en el pH y la conductividad tras la incorporación de la combinación de extractos, se puede pensar que estos alteran la fuerza iónica del sistema de gel, pudiendo ser uno

de los factores que influiría directamente en las propiedades físicas (dureza, adhesividad, viscosidad y extensibilidad) analizadas.

Actividad antibacteriana de los geles

Técnica en medio sólido

Todos los geles presentaron actividad antibacteriana, el halo de inhibición generado frente a cepas de *Staphylococcus* varió de $8,7 \pm 0,6$ a $15,3 \pm 0,6$. Las formulaciones más fluidas y con menor consistencia generaron mayores halos de inhibición.

Como se explicó previamente, no existe un criterio unánime para evaluar la potencia antimicrobiana de los productos naturales y valores de cortes a partir del cual la actividad antibacteriana de productos naturales pueda clasificarse como aceptable.

Tabla 20. Halos de inhibición (mm) de las formulaciones en geles.

Formulación	Cepa		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
Ciprofloxacina	$38,0 \pm 0,0$	$29 \pm 1,0$	$29,7 \pm 0,6$
F1	$11,2 \pm 0,1$	$8,25 \pm 0,0$	$9,0 \pm 0,0$
F2	$9,3 \pm 0,6$	$8,7 \pm 0,6$	$10,5 \pm 0,5$
F3	$12,5 \pm 0,0$	$8,5 \pm 0,0$	$8,5 \pm 0,0$
F4	$9,7 \pm 0,6$	$8,7 \pm 0,6$	$9,6 \pm 0,6$
F5	$15,3 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,6$	$12,3 \pm 2$
F6	$10,2 \pm 0,0$	$9,0 \pm 0,0$	$11 \pm 0,0$
F7	$11,0 \pm 0,0$	$9,0 \pm 0,0$	$12 \pm 0,0$
F8	$10,0 \pm 0,0$	$9,0 \pm 0,0$	$13 \pm 0,0$
F9	$10,6 \pm 0,57$	$11,6 \pm 0,6$	$10 \pm 0,5$
F10	$10,3 \pm 0,57$	$11,3 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,6$
F11	$9,6 \pm 0,57$	$11 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,6$

Martins et al. (2014 y 2015) proponen los siguientes criterios de clasificación para la actividad antibacteriana: débil cuando el halo está entre 3 y 7 mm, moderado cuando el halo está entre 8 y 10 mm y fuerte cuando el halo es igual o mayor que 11 mm. A su vez (Koohsari, Ghaemi, Poli

Shesh, & Sadegh, 2013) consideran que los halos iguales o superiores a 12 mm pueden considerarse como un buen efecto inhibidor de los extractos.

La Tabla 20 muestra los resultados de la actividad antimicrobiana de las formulaciones en gel recién elaboradas. Los halos de inhibición oscilaron entre $9,33 \pm 0,57$ y $15,3 \pm 10,6$ mm para *S. aureus* ATCC 25923; entre $8,25 \pm 0,57$ y $11,6 \pm 0,57$ mm para *S. aureus* ATCC 29213 y entre $8,5 \pm 0,57$ y $12,13 \pm 2$ para *S. epidermidis* ATCC 12228.

De acuerdo con los criterios antes mencionados, se puede considerar que los geles exhiben una inhibición de moderada a fuerte. Cabe señalar que estos halos se generan a partir de 25 mg de gel, que contiene 0,75 mg de la mezcla de extractos.

Estos valores son alentadores porque los estudios sobre productos naturales han demostrado que los extractos hidroalcohólicos de otras especies de *Lippia* generaron un halo de 21 mm para *S. aureus* ATCC 25925 a partir de 2,5 mg de extracto (Wasihum, Adraro, & Ali 2014); halos de 13 mm para *S. aureus* PTCC 1436 y 17 mm para *S. epidermidis* PTCC 1435 a partir de 12,5 mg (Koohsari et al., 2013). En general, los extractos hidroalcohólicos de otros géneros de plantas tienen una actividad antibacteriana débil o nula (Martins et al., 2014, 2015), o requieren concentraciones más altas para producir una buena inhibición (Zêñao, Alfredo, Dias, Saavedra, & Fernandes, 2017).

Por otro lado, es interesante que las formulaciones presenten buena actividad contra estas bacterias porque *S. aureus* es responsable de algunas patologías dermatológicas como el impétigo y la foliculitis (Millet et al., 2016). De esta forma, podría existir una alternativa disponible para la prevención y el tratamiento de algunas infecciones dérmicas, para evitar recurrir como primera opción a un antibiótico sintético. Esto es importante porque el uso indiscriminado de antibióticos fue uno de los factores que condujo a la resistencia bacteriana actual (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Técnica en medio líquido

En la figura 61 se pueden observar las curvas del crecimiento microbiano en ausencia (control) y en presencia de 0,1 g de distintos geles seleccionados en base a sus características antes evaluadas. Las formulaciones probadas inhiben el crecimiento microbiano, la cual es más notoria después de las 4 horas, alcanzando una diferencia de hasta 10 unidades logarítmicas con respecto al control de crecimiento al final del ensayo. Este comportamiento indica que las formulaciones son bacteriostáticas.

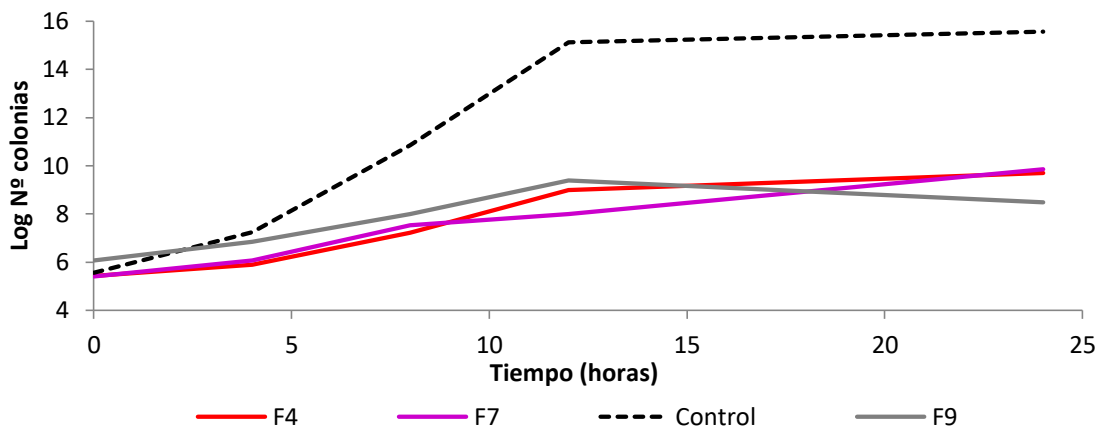


Figura 61. Cinética de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 en ausencia y presencia de las formulaciones evaluadas.

El efecto bacteriostático podría deberse a la limitada solubilidad de los extractos contenidos en los geles, ya que los mismos no son totalmente solubles en agua, Esta limitación se evidenció por la formación de un precipitado en los tubos con medios de cultivo acuoso.

Permeación in vitro

El principio activo de los geles estudiados son los polifenoles de los extractos, los cuales tienen antecedentes como agentes antimicrobianos y antiinflamatorios. Las formulaciones están desarrolladas para aplicación tópica con efecto antibacteriano local sobre las lesiones cutáneas. La prueba de permeación se realizó para conocer el comportamiento de los polifenoles cuando se aplica sobre la piel.

En la tabla 21 se expresan los parámetros calculados a partir de la curva de permeación (figura 63) de la cantidad acumulada de polifenoles permeados por área en función del tiempo en horas.

Los flujos de permeación estuvieron comprendidos entre $8,95 \pm 1,18$ (F7) y $24,40 \pm 1,41$ $\mu\text{g GAE} / \text{cm}^2 \cdot \text{hora}$ (F2). El ANOVA de los valores de flujo y la prueba post hoc de Tuckey ($\alpha = 0,05$) mostró diferencias significativas entre las formulaciones. Al final del estudio de permeación, F2 tuvo un mayor porcentaje de permeación ($29 \pm 3\%$) y F7 tuvo menor permeación ($18 \pm 1\%$).

El valor de pH del vehículo, la solubilidad del fármaco en el vehículo y la viscosidad de la matriz del gel son tres factores importantes a considerar en la evaluación de la penetración del fármaco desde una forma de dosificación en gel a través de la membrana o la piel (Ygartua, Arellano, Santoyo, & Martín, 1998).

5. Resultados y discusión

Tabla 21. Parámetros evaluados a partir de la cinética de permeación de polifenoles.

Gel	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	Cantidad permeada a 6h (μg)	% Permeado	Retenido en piel (μg)	% de Retención	Kp (cm/h)
F2	$17,53 \pm 2,76^a$	$373,98 \pm 10,82$	29 ± 3	$135,86 \pm 14,84$	10,5	$0,0135^a$
F4	$24,40 \pm 1,41^b$	$361,38 \pm 53,54$	23 ± 5	$128,33 \pm 4,19$	7,9	$0,0150^{a,b}$
F5	$13,54 \pm 1,66^{a,c}$	$225,06 \pm 54,94$	18 ± 4	$175,86 \pm 21,66$	14,18	$0,0110^{b,c}$
F7	$8,95 \pm 1,18^c$	$214,34 \pm 19,17$	18 ± 1	$179,21 \pm 12,54$	14,85	$0,0075^c$
F9	$18,61 \pm 2,26^a$	$288 \pm 51,76$	30 ± 6	$134,34 \pm 10,82$	14,09	$0,0195^e$

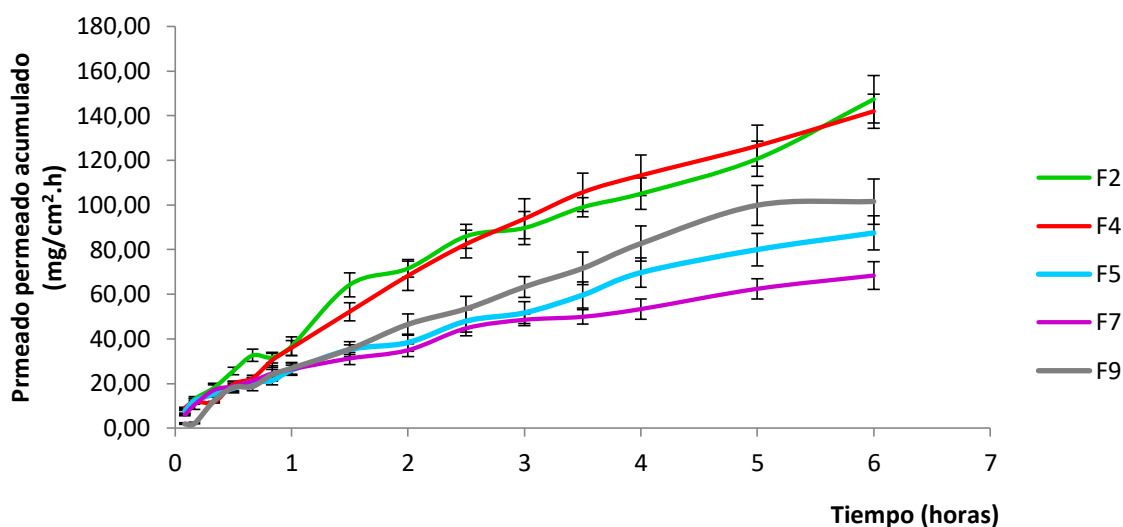


Figura 62. Curvas de permeación de polifenoles en las formulaciones en función del tiempo

La permeación de un agente terapéutico en la piel es un proceso de múltiples etapas que incluye la liberación del agente terapéutico de la formulación tópica y luego su permeación en la piel. Durante los últimos 15 años, muchos estudios han tratado de investigar la influencia de las características reológicas sobre la velocidad de liberación del fármaco desde geles y las relaciones entre la reología, los perfiles de liberación y la permeación de las formulaciones tópicas. Sin embargo, esta relación entre ellos todavía está en disputa, y no se ha llegado a un acuerdo sobre esta cuestión. Por ejemplo, Welin.Berger et al., (2001) consideran que un aumento en la viscosidad de la matriz puede afectar negativamente tanto la liberación como la permeación del compuesto activo, mientras que Reichling et al., (2006) demostraron que los procesos de permeación son independientes de la liberación, los cuales sí se asocian a la viscosidad del preparado.

Los resultados obtenidos mostraron que han permeado en mayor porcentaje y tuvieron mayor flujo de permeación las formulaciones que presentaron menor dureza y mayor viscosidad. Contrariamente, aquellas formulaciones que presentaron mayores valores de dureza y menor viscosidad, fueron las que presentaron mayor porcentaje de polifenoles retenidos en piel. El análisis estadístico determinó que hay diferencias significativas en los coeficientes de permeación, por lo cual, la matriz que contiene el extracto, definitivamente afecta su permeación en piel. Al igual que Reichling et al., (2006), en este trabajo no se encontró una relación entre la viscosidad y los resultados de permeación obtenidos.

Es de esperar que la forma farmacéutica de gel, que tiene un alto contenido de agua, no presente un alto porcentaje de permeación; pero los componentes de la fórmula, como el propilenglicol y el etanol, que actúan como cosolventes del extracto pueden influir en la penetración del extracto a través de la piel. También se debe tener en cuenta que la permeabilidad cutánea en parte está determinada por las propiedades fisicoquímicas favorables de las moléculas de principio activo, incluyendo el peso molecular pequeño y el coeficiente de partición aparente n-octanol/agua (Dong et al., 2015).

El coeficiente de permeación de la combinación de extractos fue 0,16 cuando se evaluó el reparto de la combinación de extractos seca, mientras que al evaluar el reparto de una solución (en propilenglicol y etanol 70%) de la combinación de extractos, el valor del coeficiente de reparto fue de 0,44. Esto indicaría que el extracto no presenta afinidad por los tejidos biológicos y que la presencia de propilenglicol y etanol en la matriz aumenta al doble la afinidad por los tejidos biológicos, sin embargo no es suficiente para esperar que se produzca la permeación en altas concentraciones.

El valor del coeficiente de permeación demuestra que el flujo (J) de los polifenoles es bajo. Al cabo de 6 horas la permeación fue igual o menor al 30% y la retención en la piel fue mínima (cerca de 10 %).

5.7 Resultados del estudio de estabilidad de los geles

Caracteres organolépticos

Cuando las formulaciones se elaboraron con extractos recién obtenidos, fueron de color verde oliva, este color se mantuvo durante una semana, pero al pasar los días se tornó marrón. Este cambio puede ser debido a la oxidación de la clorofila, dado que el mismo cambio se pudo observar en los extractos almacenados en botellas de vidrio color verde oscuro a 8 °C. El cambio fue más notable en el extracto de *L. alba* porque éste es de color verde oscuro en un principio, mientras que el extracto de *L. turbinata* es marrón desde el momento en que se lo obtiene.

5. Resultados y discusión

En ambas condiciones de almacenamiento (estabilidad acelerada y condiciones ambientales), los geles no mostraron cambios en la apariencia general ni olor, y no se observaron signos de inestabilidad física.

Los estudios que involucran geles con extractos vegetales elaborados con Carbopol® y derivados de celulosa, han mostrado que en general suelen ser estables en distintas condiciones de almacenamiento y que no se observan cambios en su apariencia (Agrawal, Baajpaye, & Singh, 2012; Amit et al., 2013; Aruna et al., 2014; Mamidi et al., 2015; Pattnaik et al., 2014; Satpathy, Sahoo, & Patra, 2011; Singh & Rohilla, 2016), sin embargo Aslani et al., (2016) han informado cambios de color y heterogeneidad a los días de elaborar geles de Carbopol® 0,5 y 1 % con 12 % de extracto hidroalcohólico de flores de *Punica granatum*, obtenido mediante percolación con etanol 70°.

pH

En ambas condiciones de estudio, el pH presentó un cambio importante a los tres meses, luego varió muy poco. Las variaciones registradas en ambas condiciones de almacenamiento son similares.

En condiciones ambientales, los geles con Carbopol® reducen entre 1,3 y 1,6 unidades de pH. La variación fue mínima a lo largo del tiempo (entre 0,8 y 0,5 unidades de pH). Los geles con CMC disminuyen 2,2 unidades de pH durante seis meses, mientras que sus geles base se mantienen constantes y, los geles con MC disminuyen 2,5 unidades y sus bases 1,7 unidades de pH.

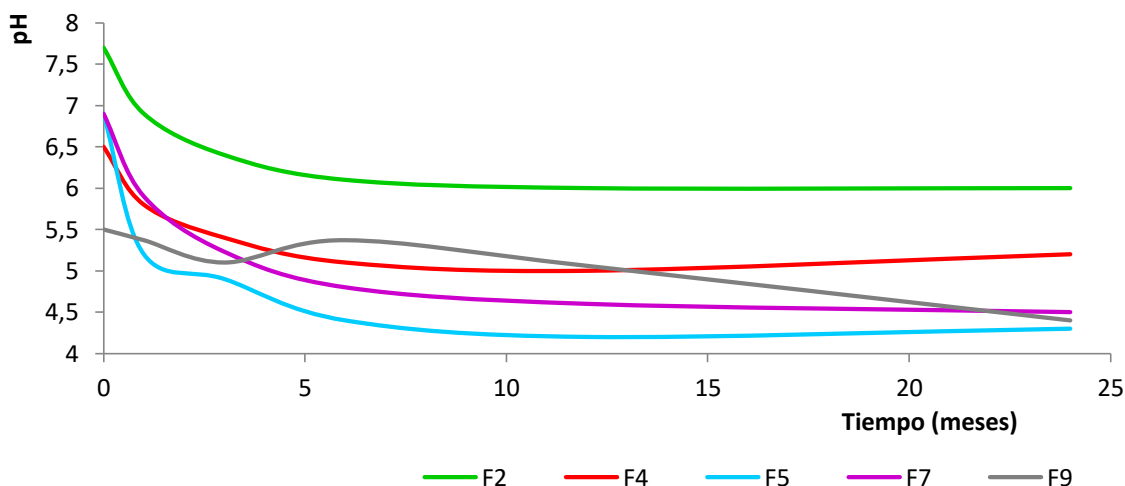


Figura 63. Variación de pH de geles herbáceos en condiciones de ambiente, durante 24 meses.

Parece ser que los cambios más importantes en las formulaciones, en caso de suceder, se darían dentro de los 3 meses luego de elaborados, dado que la mayoría de los trabajos reportan estudio de estabilidad durante 3 meses o 90 días, algunos pocos extienden el estudio hasta 6 meses.

En los geles con extractos vegetales, el valor de pH de las distintas formulaciones disminuyó con el tiempo. Esta variación podría deberse al tipo de extracto utilizado y a la cantidad de extracto en la formulación, debido a que sea realizó un seguimiento de las características físico-químicas de la combinación de extractos, y su pH varió en la misma magnitud (datos no mostrados). Resultados similares fueron observados por Aslani et al. (2016) en geles de Carbopol® 934 y CMC con 12 % de extracto, donde el pH disminuyó levemente durante 6 meses, y el extracto puro varió en la misma medida. También se ha visto disminución de pH en geles de Carbopol® 934 con 2 % de extracto (Gaikwad & Banerjee, 2013). Generalmente no suelen haber variaciones importantes en el pH, por lo que se pueden considerar formulaciones estables (Gawai et al., 2016; Haque et al., 2014; Mamidi et al., 2015; Muthu Lakshmi et al., 2014; Pattnaik et al., 2014; Rajesh et al., 2014; Satpathy et al., 2011) incluso a 40 °C y 75 % HR (Singh & Rohilla, 2016).

Viscosidad

La viscosidad de todos los geles aumentó con el paso del tiempo. Probablemente esto se deba a la pérdida de peso que sufren los sistemas cuando son conservados en el tiempo (ver más abajo). La pérdida de agua en los sistemas produce un incremento en la viscosidad de los sistemas. Estos resultados se condicen con otros estudios donde mostraron que en geles de Carbopol® 1 % se puede observar un aumento de viscosidad a partir de los 30 días (Gaikwad & Banerjee 2013; Gawai et al., 2016; Jyothi & Koland, 2016).

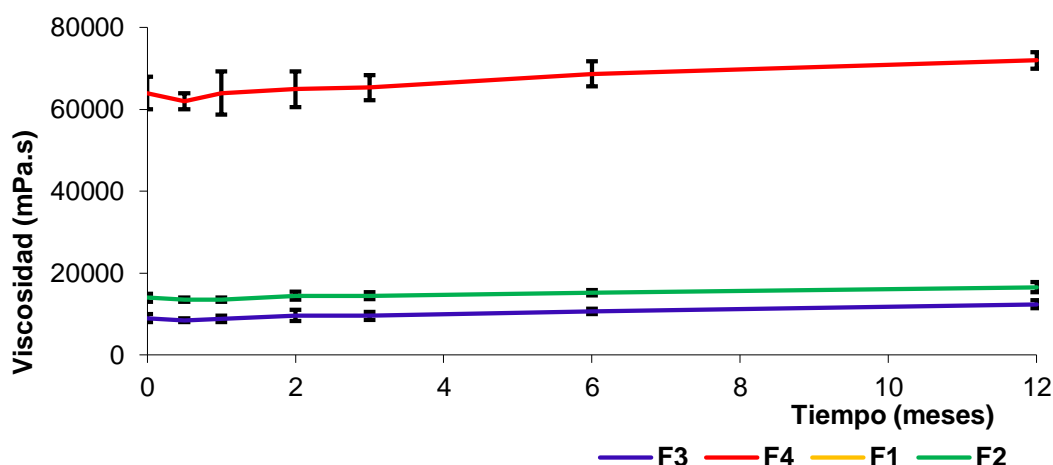


Figura 64. Viscosidad de las formulaciones con Carbopol® durante 12 meses.

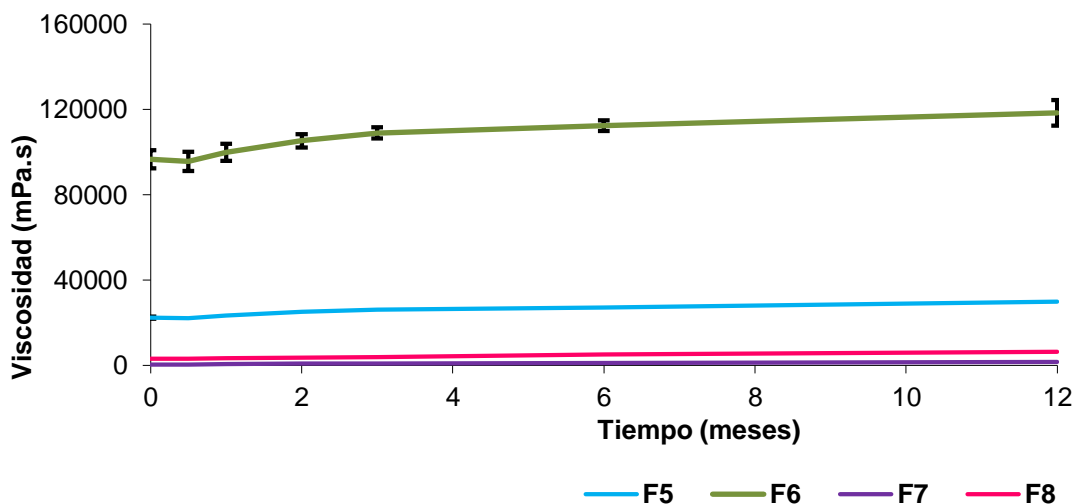


Figura 65. Viscosidad de las formulaciones con polímeros de celulosa durante 12 meses.

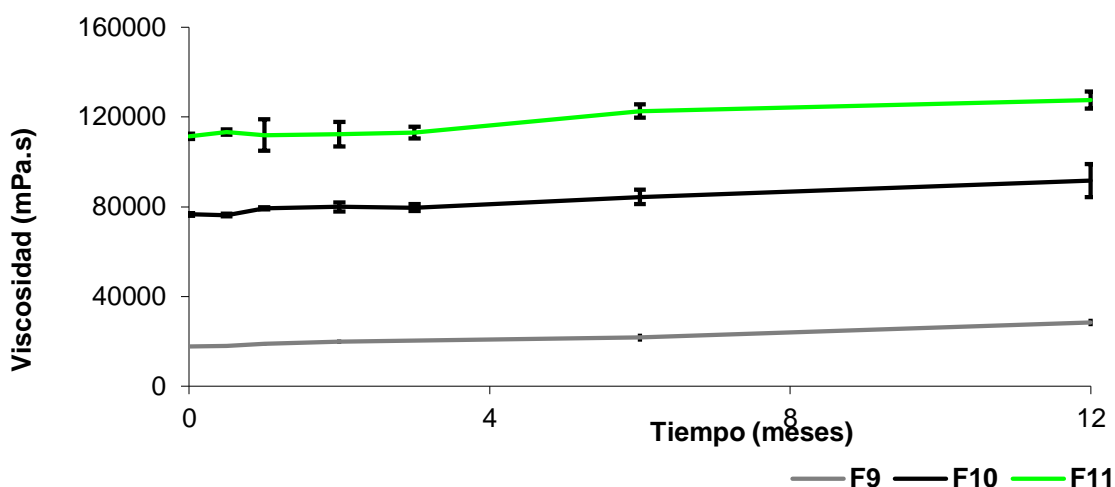


Figura 66. Viscosidad de las formulaciones con Sepigel® durante 12 meses.

Extensibilidad

Los geles de Carbopol® disminuyen la extensibilidad en ambas condiciones, pero no se observaron diferencias significativas en todos los casos. Sus bases presentan el mismo comportamiento.

Los geles con MC y CMC tienden a disminuir la extensibilidad en ambas condiciones de estabilidad, y esto se debe a que los preparados se vuelven más firmes, pero esto no ocurre con sus bases.

Los geles con Sepigel® presentan el mismo comportamiento. La tendencia que se observa con todos los polímeros aquí estudiados, es que la viscosidad aumenta y la extensibilidad disminuye

luego de un tiempo de elaborados los geles, independientemente de las condiciones de almacenamiento. Probablemente esto se relaciona con la pérdida de humedad que sufren los geles.

Algunos trabajos sobre geles de Carbopol® 940, 934 y CMC, indicaron que la extensibilidad tiende a disminuir en el tiempo (Haque et al., 2014; Muthu Lakshmi, Radha & Jayshree, 2014; Rajesh et al., 2014). Contrariamente a esta tendencia, Gaikwad & Banerjee (2013) han encontrado que luego de 3 meses la extensibilidad de geles de Carbopol® 934 con 2 % de extracto vegetal aumentó levemente.

Variación de peso

En la Figura 67 se grafica el porcentaje promedio de peso perdido en los geles con extracto (en base al peso inicial) almacenados en estante (Ext Estante), las bases almacenadas en estante (Base Estante), los geles con extracto almacenados en condiciones estabilidad acelerada (Ext Estufa) y las bases almacenadas en condiciones de estabilidad acelerada (Base Estufa).

Durante 18 meses, todas las formulaciones tuvieron una pérdida de peso constante. Esto se podría justificar por la evaporación de agua de la formulación, por lo cual se supone que el cierre del envase no es hermético. Los geles en condiciones ambiente perdieron más peso que los geles en condiciones de estabilidad acelerada. Es de esperar que a mayor temperatura se produzca mayor evaporación de agua, pero como a 40 °C la HR fue mayor (75 %) que a temperatura ambiente (60%), probablemente esto limitó la pérdida de agua de la formulación y en consecuencia la pérdida de peso es menor. En general, las bases pierden menos peso que los geles que contienen el extracto. Esto podría deberse a que los geles con extracto presentarían una estructura interna de gel más laxa (justificada por las consecuencias del aumento de la fuerza iónica, como se explicó anteriormente) y el agua se evaporaría con más facilidad al no encontrarse atrapada por las cadenas poliméricas.

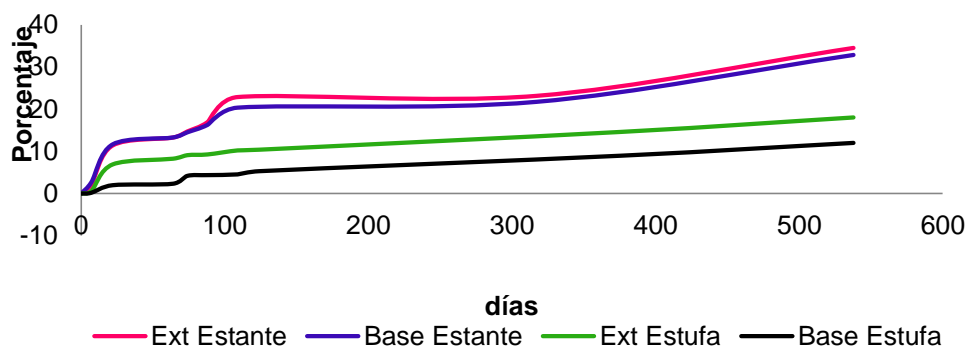


Figura 67. Variación del porcentaje del peso perdido promedio en geles con extracto y geles bases, conservados en condiciones ambiente y condiciones de estabilidad acelerada.

5. Resultados y discusión

El envase en este caso, aunque presenta una tapa a rosca, por la pérdida de peso en el tiempo, evidencia que no posee un cierre hermético y por esto la humedad del ambiente afectaría la evaporación de agua y pérdida de peso.

Estabilidad química en el tiempo

Los geles elaborados con gelificantes iónicos presentaron un descenso en el contenido de polifenoles, mientras que los geles con MC y CMC presentaron un aumento del contenido de polifenoles. La tendencia ha sido similar en ambas condiciones de almacenamiento.

El descenso alcanzó hasta el 51 % al cabo de 12 meses para F4, y el incremento fue de hasta el 187 % para F5 a los 12 meses. La formulación más estable fue F9 porque presentó la mínima variación del contenido de polifenoles a los 12 meses (20 %). La variación registrada en ambas condiciones de almacenamiento fue similar cuando se compara a los 3 y 6 meses, pero a los 12 meses se notaron diferencias considerables en el porcentaje de variación del contenido de polifenoles.

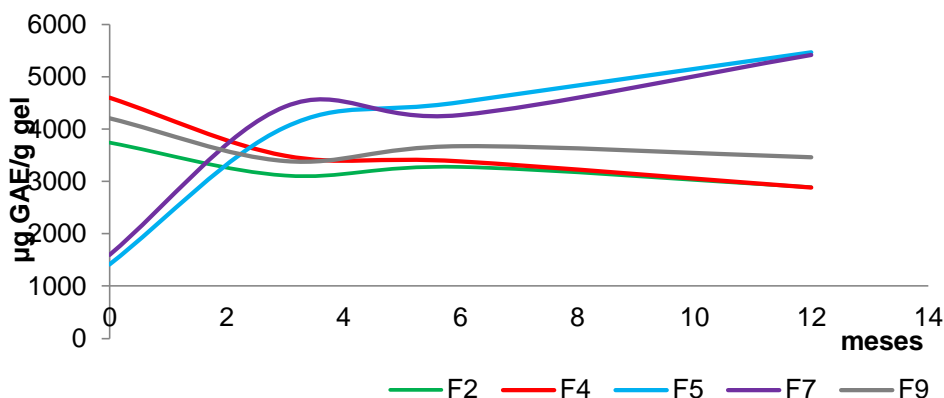


Figura 68. Contenido de compuestos fenólicos medido durante 12 meses en geles conservados en condiciones ambiente.

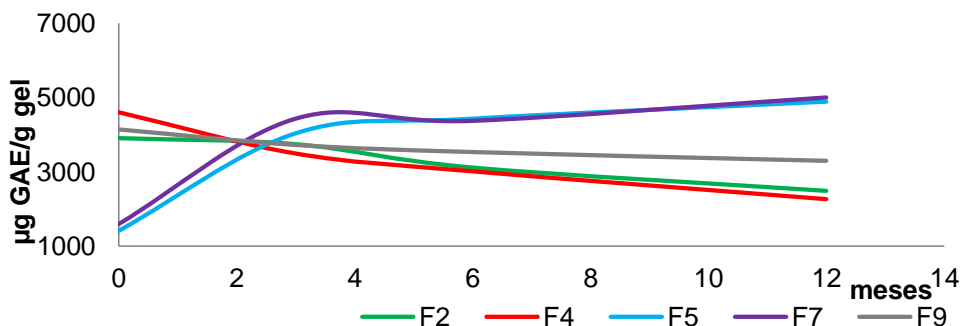


Figura 69. Contenido de polifenoles medidos durante 12 meses en geles sometidos a condiciones de estabilidad acelerada.

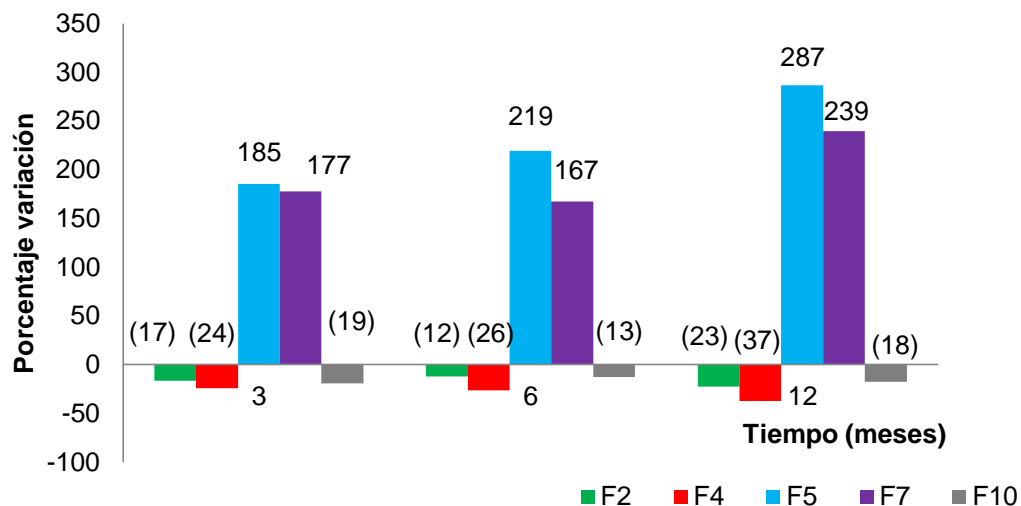


Figura 70. Porcentaje de variación en el contenido de compuestos fenólicos durante 12 meses.

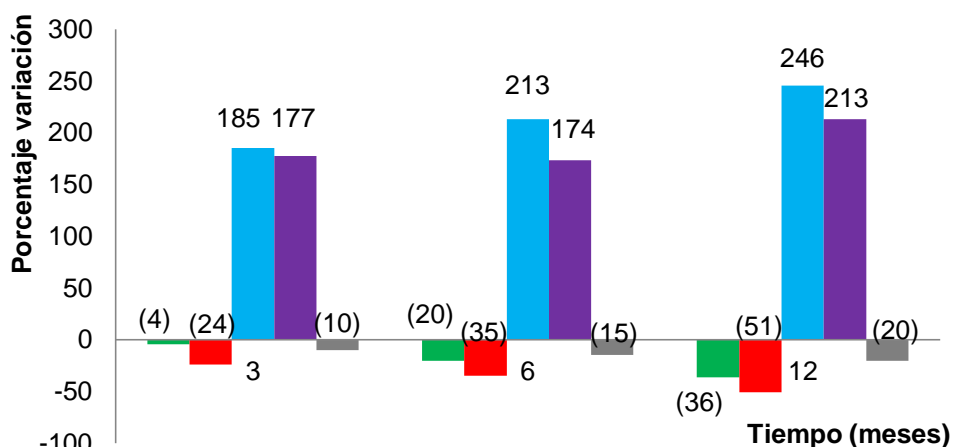


Figura 71. Porcentaje de variación en el contenido de compuestos fenólicos de geles sometidos a 45 °C y 75 % HR.

El contenido de compuestos fenólicos se mide mediante la reacción de Folin-Ciocalteu. En esta reacción, el reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce frente a compuestos con estructura de tipo fenol en medio alcalino, virando de amarillo a azul.

Los compuestos fenólicos presentes en un extracto crudo pueden ser de distinta naturaleza química. Por ejemplo, los flavonoides poseen una estructura básica de fenol que produce una reacción positiva frente al reactivo de Folin-Ciocalteu. Estas moléculas activas se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, pero su forma de aglicón es más reactiva aún (Martínez-Flórez et al., 2002). Probablemente durante el almacenamiento, los componentes del extracto sufrieron algún cambio químico, como por ejemplo, hidrólisis, traduciéndose en aumento del poder reductor

y en consecuencia, a igual cantidad de muestra se registra mayor concentración de polifenoles en los geles mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

La concentración de compuestos fenólicos varió de $4,15 \pm 0,12$ a $3,7 \pm 0,44$ mg EAG/g durante 12 meses y se registró un leve aumento a los 18 meses. La disminución del contenido de fenoles en un año pudo deberse a una oxidación de los compuestos activos, debido a que el envase no es hermético y permite el intercambio gaseoso y la entrada de oxígeno del ambiente. El leve aumento hacia el año y medio pudo deberse a la hidrólisis de moléculas activas frente a la reacción redox que se produce en la determinación, que en consecuencia generarían mayor coloración con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Al final del periodo de estudio, el contenido de compuesto fenólicos disminuyó entre 13 y 38 % del valor inicial, siendo las formulaciones F9 y F2 las que presentaron menor variación. Jyothi y Koland (2016) han estudiado la estabilidad durante 90 días, de geles de Carbopol® 1 % y de HPMC al 1 %, conteniendo 5 % de extracto, mostrando una disminución de 5%. Por otro lado Rajesh et al. (2014) encontraron que el contenido de droga vegetal disminuyó entre 1.82 y 1,87% a las 6 semanas.

Como no existe legislación que establezcan límites de contenido de principio activo, ni metodología de análisis para extractos vegetales, y considerando la susceptibilidad de los componentes de un extracto (polifenoles sensibles a la oxidación), podría considerarse como aceptable aquellas que no hayan disminuido más del 20 % en el lapso de 12 meses. Para adoptar este criterio es necesario tener presente el fin para el que se va a emplear y evaluar si conserva la actividad biológica deseada. Dado que los extractos vegetales, al ser mezclas complejas, presentarán un comportamiento diferente a las moléculas de principios activos sintéticos, es necesario realizar un seguimiento para determinar cuándo pierden eficacia y definir criterios de aceptación respecto de la cuantificación de polifenoles en una formulación.

Efecto antimicrobiano en el tiempo

En el momento inicial, los halos de inhibición estuvieron comprendidos entre 7.33 y 22 mm. A lo largo del tiempo la actividad antimicrobiana de los geles disminuyó.

Después de someter las formulaciones a 40 °C y 75 % HR, se pudo observar una disminución en el halo generado con *S. aureus* ATCC 25923. Después de 6 meses, todas las formulaciones disminuyeron su actividad contra la cepa antes mencionada, y algunos mostraron cambios en la actividad contra *S. aureus* 29213 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

Aunque una modificación del halo de inhibición generado por las formulaciones ocurre con el tiempo, en la mayoría de los casos esta disminución fue mínima durante los 6 meses analizados y las formulaciones mantuvieron la actividad antibacteriana contra las cepas probadas. Al año los

geles de Carbopol® disminuyeron su acción antimicrobiana, mientras que los geles con derivados de celulosas y Sepigel® conservaron su potencia antimicrobiana.

Tabla 22. Halos de inhibición (mm) de las formulaciones determinados en distinto tiempos.

Formulación	Tiempo de análisis	Cepas		
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
F2	Tiempo 0	9,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	10,5 ± 0,5
	Tiempo 6 Amb	6,0 ± 0	8,5 ± 0,5	10,2 ± 1,0
	Tiempo 6 EA	6,3 ± 0,6	8,16 ± 0,28	9,0 ± 1,0
F4	Tiempo 0	9,7 ± 0,6	8,7 ± 0,57	9,7 ± 0,6
	Tiempo 6 Amb	10,3 ± 0,6	8,3 ± 0,57	9,2 ± 0,3
	Tiempo 6 EA	6,3 ± 0,6	8,5 ± 0,5	7,3 ± 0,57
F5	Tiempo 0	15,3 ± 0,6	10,66 ± 0,57	12,3 ± 2,1
	Tiempo 6 Amb	12,7 ± 2,1	8,0 ± 1,0	12,8 ± 0,8
	Tiempo 6 EA	7,3 ± 0,6	7,6 ± 0,6	11,3 ± 0,6
F7	Tiempo 0	17,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0	11,6 ± 0,6
	Tiempo 6 Amb	11,0 ± 1,0	11,6 ± 0,6	12,8 ± 0,8
	Tiempo 6 EA	8,3 ± 0,6	11,0 ± 1,0	11,3 ± 0,6
F10	Tiempo 0	10,3 ± 0,6	11,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6
	Tiempo 6 Amb	9,5 ± 0,5	10,3 ± 0,4	9,5 ± 0,5
	Tiempo 6 EA	10,0 ± 0,5	11,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5

Amb: ambiente (indica las formulaciones que se almacenaron a 25 °C y 58 % HR)

EA: estabilidad acelerada (indica las formulaciones almacenadas a 40 °C y 75 % HR)

Control higiénico en el tiempo

Las formulaciones evaluadas han presentado un recuento de microorganismo que estuvo dentro del límite establecido por la farmacopea para productos no obligatoriamente estériles hasta los 18 meses. No presentaron contaminación por *Escherichia coli* ni *Pseudomonas aeruginosa*. Si han sufrido contaminación microbiana a los 24 meses. Esto evidencia la aptitud de los productos naturales como conservantes de la formulación durante 18 meses. Este hecho es de interés, debido a que la tendencia hoy es emplear compuestos obtenidos de fuentes naturales, caracterizados como seguros para las personas y efectivos contra los microorganismos, para disminuir o eliminar el uso de conservantes químicos tradicionales y formular cosméticos con propiedades dermocosméticas mejoradas (Papageorgiou, Varvaresou, Tsirivas, & Demetzos, 2010). Esto es motivado en parte por el creciente escepticismo de los consumidores con respecto a la seguridad de los conservantes químicos en combinación con el hecho de que la salud duradera de la piel a menudo se asocia con el uso de ingredientes naturales.

5. Resultados y discusión

Los conservantes de productos farmacéuticos pueden ser: parabenos, fenol, alcohol bencílico, clorobutanol y derivados mercuriales: nitrato fenilmercúrico y tiomersal.

Los de uso más común son los parabenos, una familia de alquil ésteres del ácido *p*-hidroxi benzoico y los ésteres más empleados son metil, etil, propil, butil y bencilparabeno. Se suelen utilizar en combinaciones entre ellos y junto con otros antimicrobianos, de esta forma se consigue un efecto sinérgico. Son activos frente a hongos y levaduras, pero también frente a bacterias, con mayor eficacia sobre las bacterias Gram positivas que sobre las Gram negativas (Díaz Ley, Heras Mendaza, & Conde-Salazar Gómez, 2006). Actualmente existe controversia acerca de su uso en productos cosméticos y medicinales.

Estudios recientes apuntan a que una fracción de los parabenos absorbidos podría retenerse sin ser metabolizada, con los consiguientes posibles efectos sistémicos. Se ha registrado que presentan capacidad sensibilizante (Pierre Lana & da Silva Martins, 2013), generando reacciones urticariales por exposición a productos tanto tópicos como sistémicos que contienen parabenos (Díaz Ley et al., 2006). En cuanto a los productos tópicos, el daño generado ha sido mayor cuando se aplican en piel dañada que en piel sana (Díaz Ley et al., 2006). Se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal y en el torrente sanguíneo, son hidrolizados a ácido *p*-hidroxibenzoico, conjugado y excretado por la orina (Hoppe & Castello Novo Pais, 2017). Cuando se aplican sobre la piel mediante productos tópicos, la absorción percutánea de los parabenos aumenta al prolongarse la cadena hidrocarbonada (al crecer su liposolubilidad) y con el incremento de la temperatura. Recientemente, el Panel de Expertos de Revisión de Ingredientes Cosméticos (Cosmetic Ingredient Review-CIR), comisión norteamericana avalada por la FDA, ha decidido reevaluar la seguridad de los parabenos (Díaz Ley, Heras Mendaza & Conde-Salazar Gómez, 2006)

Por otra parte, se ha encontrado presencia de parabenos en aguas de ríos y éstos pueden tener efectos negativos en los ecosistemas acuáticos como disminución de la eclosión de huevos de pájaros, peces y tortugas; feminización de peces machos, problemas reproductivos en peces, reptiles, pájaros y mamíferos; y alteraciones en el sistema inmunológico de mamíferos marinos (Dos Anjos, 2017).

El uso de productos naturales como conservantes constituye una alternativa para disminuir el uso de compuestos sintéticos, con la correspondiente disminución en el impacto ambiental además de los beneficios buscados en la salud humana. Las plantas son una fuente potencial de moléculas activas, muchos metabolitos secundarios han mostrado ser buenos agentes antimicrobianos; como por ejemplo: saponinas, aceites esenciales, ácido benzoico, ácido salicílico, fenoles, ácido úsnico, timol y bacteriocinas (Castelli, Cozzi, López, & Derita, 2009; Mosquera Tayupanta, 2014). Por lo que la tendencia en la actualidad, tanto de las industrias como de los consumidores es recurrir a

los productos naturales como principios activos y excipientes de formulaciones cosméticas y farmacéuticas.

Características y evaluación de las formulaciones para uso en la mucosa oral: películas o *films* bucales

5.8 Resultados de las formulaciones de uso en mucosa oral: Películas

5.8.1 Películas de HPMC

Preformulación

Al humectar con agua el polímero de HPMC, se formaron grumos que fueron difíciles de eliminar para lograr un gel homogéneo. La constante agitación incorporó burbujas en el gel, las cuales fueron eliminadas con dificultad. A mayor concentración de polímero, hubo dificultad para eliminar las burbujas. Sin embargo, las películas lograron formarse en todos los casos en el rango de concentraciones trabajado (1-4 %).

En algunas películas se observó un aspecto poco agradable a la vista; resultaron secas, duras, con bordes irregulares, los cuales se enrollaron cuando el plastificante fue propilenglicol o glicerina al 5%. Dispersiones de HPMC al 2 y 4% fueron muy viscosas y difíciles de manejar para elaborar este tipo de producto. La glicerina en concentraciones mayores a 5% no se incorporó exitosamente a la estructura del film, porque se apreció un residuo oleoso sobre la superficie de las películas. En cuanto al propilenglicol, la concentración a la que se obtuvo una película de aspecto homogéneo y liso fue de 15%.

A una concentración de polímero del 1 % se logró formar películas con aspecto homogéneo, que se desprendieron del molde sin mayor esfuerzo, pudiendo incorporar cantidades variables de la combinación de extractos, pero la mejor apariencia se logró cuando se incluyó 3% de la combinación de extractos a la dispersión formadora de película. Esta cantidad equivale a incorporar 8 veces la CIM de la combinación de extractos por gramo de dispersión formadora de película. Cada film contiene 2,4 veces la CIM, lo cual sería beneficioso para su acción en la mucosa oral. La película con HPMC al 1% y 3% de la combinación de extractos fue la seleccionada para posteriores estudios. La composición de la solución formadora de película se detalla en tabla 23.

5.8.2 Películas de Eudragit® E100

En el desarrollo de películas con Eudragit® E100 se encontró que a mayor concentración de polímero y menor concentración de extractos fue más difícil lograr un film de buen aspecto.

En general las películas obtenidas con este polímero resultaron quebradizas y heterogéneas. Hubo dificultad para incorporar con éxito los extractos a la mezcla. Estas características no mejoraron al mezclar con HPMC, por lo que las formulaciones que contienen este polímero fueron descartadas.

5.8.3 Películas de Eudragit® S100

Con este polímero se lograron películas con un aspecto no uniforme, bordes gruesos, centro claro, con burbujas, pegajosas y elásticas. Al aumentar la concentración de polímero se obtuvieron películas más gruesas y duras pero que no resultaron adhesivas. Las burbujas se eliminaron con dificultad.

Debido a que las películas logradas con este polímero no reunieron los criterios de aceptación para pasar esta etapa de pre-formulación, también se han desestimados las fórmulas con este polímero.

5.8.4 Películas de Eudragit® L100

Las películas que contenían este polímero al 1% disuelto en acetona, mantuvieron la forma del molde al secarse y cuando se desmoldaron no resultaron pegajosas, lo cual es una característica favorable para su manipulación.

Al emplear metanol como solvente del polímero, las películas se moldearon bien y se desmoldaron sin inconvenientes pero se adhirieron al papel aluminio donde se las colocó para su almacenamiento.

En concentraciones de polímero mayores al 1%, las películas resultantes fueron más gruesas, con burbujas difíciles de eliminar, con textura y aspecto plástico.

Las películas logradas con la combinación de Eudragit® L100 1% y HPMC 1% presentaron aspecto agradable, homogéneo y no resultaron pegajosas al manipularlas, por lo que fueron consideradas para continuar su estudio.

5.6.5 Películas de Eudragit® L100-55

Las formulaciones en las que se empleó metanol o etanol como solvente resultaron heterogéneas, pegajosas y poco resistentes, se quebraron con facilidad y se desprendieron con dificultad del molde. Al aumentar la concentración del polímero se lograron desprender sin que se rompan y se logró un aspecto más agradable, aunque siguieron siendo adhesivas al tacto.

Al preparar las películas con acetona se logró mejorar el aspecto, la homogeneidad, con superficie lisa; se desmoldaron sin dificultad y no fueron adhesivas al tacto al manipularlas.

Las películas logradas con la combinación de Eudragit® L100-55 1 % y HPMC 1 % presentaron aspecto agradable, homogéneo y no resultaron pegajosas al manipularlas, por lo que fueron consideradas para continuar su estudio.

5.9 Características de las películas bucales seleccionadas

Teniendo en cuenta la facilidad en la preparación de las soluciones, la facilidad para desmoldar las películas y el aspecto general, fueron seleccionadas las formulaciones que se indican en la tabla 23.

Luego de probar con dos edulcorantes a distintas concentraciones, se decidió incorporar sacarina al 0,1 % empleando como disolvente una mezcla de alcohol isopropílico: etanol (1:2,5).

Tabla 23. Composición porcentual (p/p) de las soluciones formadoras de películas seleccionadas.

Componente	P1	P2	P3	P4	P5	P6
HPMC KP15M	1	-	-	1	1	-
Eudragit® L100	-	1	-	1	-	0,5
Eudragit® L100-55	-	-	1	-	1	0,5
Propilenglicol	15	15	15	15	15	15
Acetona	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Agua	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Alcohol isopropílico: etanol (1:2,5)	-	23	23	12,5	12,5	12,5
Extractos	3	3	3	3	3	3
Sacarina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

c.s.: cantidad suficiente

5.9.1 Características organolépticas y físico-químicas

Las películas fueron de color marrón como se puede observar en la figura 74, inodoras, con superficie lisa, sin burbujas, con brillo, con sabor dulce agradable. Se las moldeó con una plantilla de silicona con oquedades de 12 mm de diámetro, y presentaron un área de 113 mm². El pH superficial promedio de todas las formulaciones fue de 6.

Las películas sin extracto resultaron incoloras, translúcidas, inodoras, sin sabor, duras y quebradizas por lo que fueron descartadas para la realización de los ensayos posteriores.

5. Resultados y discusión

Las películas de 12 mm de diámetro presentaron un espesor promedio variable, con una alta desviación estándar, siendo el rango de $68,83 \pm 29,69$ a $121,92 \pm 57,25$ μm . La variación de espesor se debió a que resultaron ser más gruesas hacia los bordes y más delgadas en el centro. A pesar de esto, el peso registrado presentó poca variación. Las películas más delgadas y livianas fueron las que se elaboraron con Eudragit® L100 solo y combinado con HPMC (P2 y P4) y, las más gruesas y con mayor peso registrado fueron las elaboradas con HPMC y Eudragit® L100-55 (P1 y P3). En base a estas observaciones, se decidió trabajar en otro molde para lograr un espesor más homogéneo.

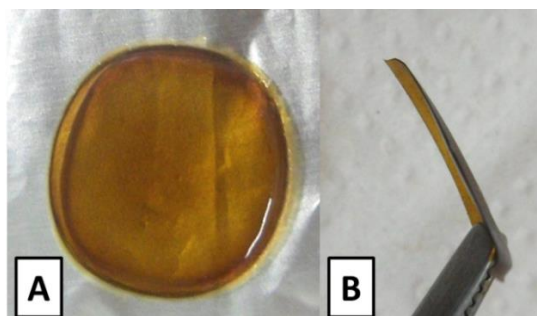


Figura 72. Fotografía de una película de Eudragit® RL 100 de 12 mm de diámetro. A) Vista de frente. B) Vista de perfil de la película cortada al medio.

Tabla 24. Peso y espesor de las películas preseleccionadas.

Formulación	Espesor (μm)	Peso (mg)
P1	$118,73 \pm 54,19$	$24,97 \pm 0,00$
P2	$70,63 \pm 41,74$	$15,83 \pm 1,16$
P3	$121,92 \pm 57,25$	$18,49 \pm 1,04$
P4	$87,56 \pm 27,63$	$16,25 \pm 1,35$
P5	$94,72 \pm 18,63$	$17,80 \pm 1,50$
P6	$68,83 \pm 29,69$	$17,31 \pm 0,85$

Liberación de polifenoles

En la evaluación de la liberación de los polifenoles desde las distintas películas se encontró que la película elaborada solo con Eudragit® L100 (P2) no logró disolverse completamente en el medio por lo que alcanzó un máximo de liberación cercano al 50 %. En cambio, las que fueron elaboradas con Eudragit® L100-55 (P3) tuvieron una rápida disolución, alcanzando la liberación completa de los polifenoles en diez minutos.

Las películas que contienen sólo HPMC (P1) liberaron el 100% a los noventa minutos. Al combinarse HPMC con Eudragit® L100-55 se aceleró el tiempo en el que se inició la liberación, luego se sostuvo en el tiempo y alcanzó el 100 % a los 120 minutos. Al combinarse HPMC con Eudragit® L100 se obtuvo un comportamiento intermedio al de estos polímeros individuales,

alcanzando el máximo porcentaje liberado (60 %) a los sesenta minutos. En las figuras 73, 74 y 75 se presenta el perfil de liberación de polifenoles desde las películas antes mencionadas.

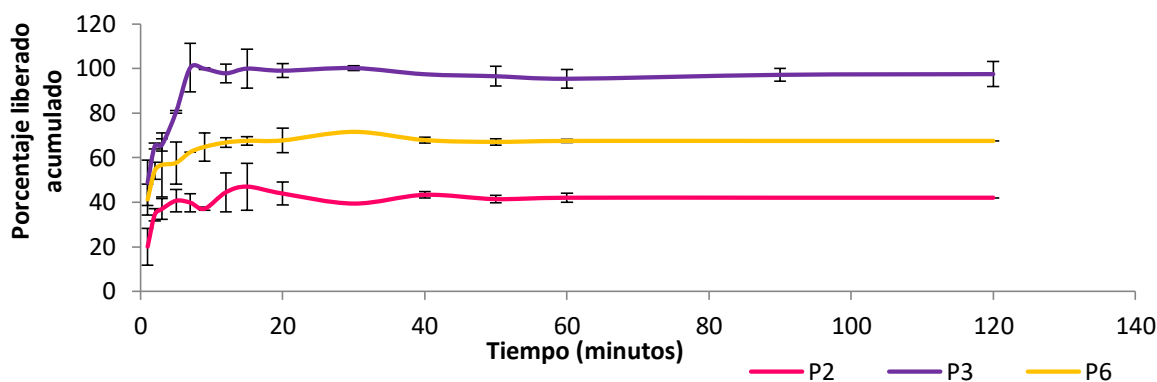


Figura 73. Cinética de liberación de polifenoles desde las películas elaboradas con Eudragit® RL100 (P2), Eudragit® L100-55 (P3) y la mezcla de ambos polímeros (P6).

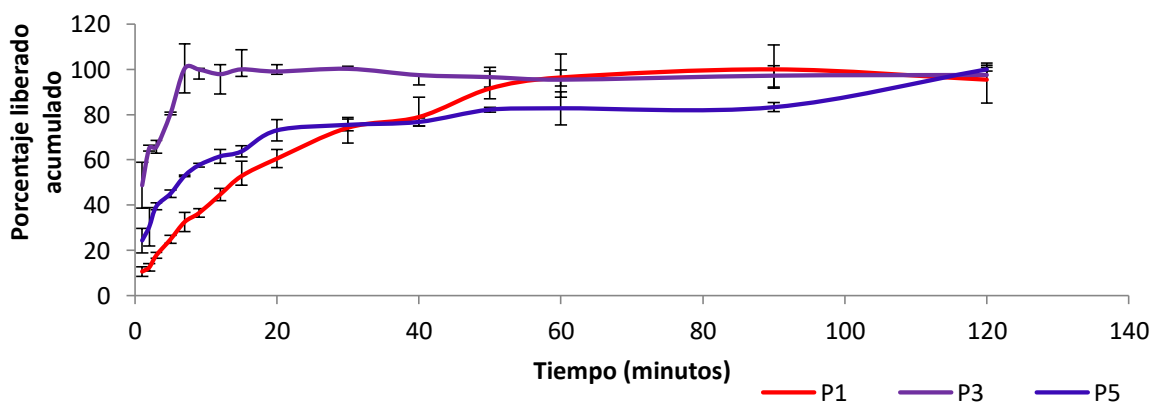


Figura 74. Cinética de liberación de polifenoles desde las películas elaboradas con HPMC (P1), Eudragit® L100-55 (P3) y la mezcla de ambos (P5).

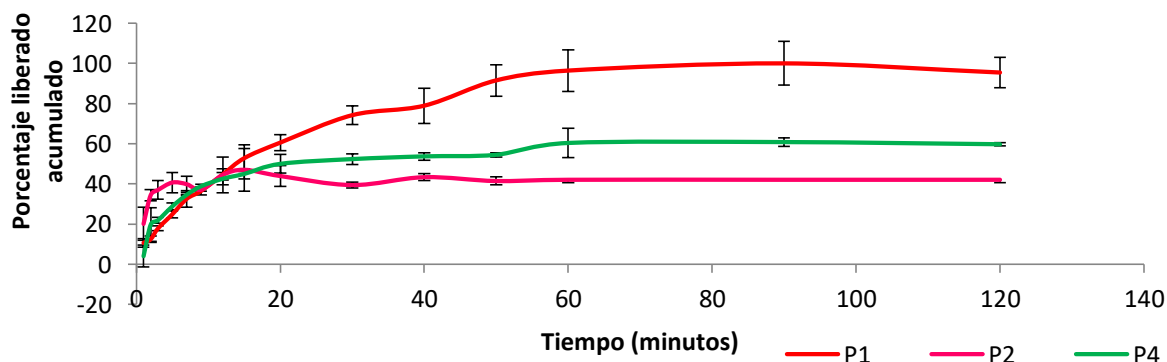


Figura 75. Cinética de liberación de polifenoles desde las películas elaboradas con HPMC (P1), Eudragit® L100 (P2) y la mezcla de ambos (P4).

5. Resultados y discusión

En las fórmulas con Eudragit® L100 se obtienen películas insolubles (P2) en las condiciones ensayas (buffer fosfato que simula la saliva, pH = 6,8, 37°C), se humectaron muy poco y liberaron menos del 50% de los polifenoles. Con Eudragit® L100-55 se obtuvieron películas (P3) con índice de humectación moderado, que se disolvieron rápidamente y liberaron los polifenoles en un lapso de tiempo breve. Las películas elaboradas con la combinación de ambos Eudragit® (P6) tuvo un comportamiento intermedio, pero no alcanzaron a disolverse completamente al finalizar el ensayo. Ninguno de los comportamientos antes descriptos es el ideal para una formulación que se aplica en boca. En cambio con HPMC se lograron películas (P1) con un alto índice de humectación que se disolvieron lentamente al cabo de dos horas. Este comportamiento se ve afectado por la incorporación de los Eudragit® a la formulación., adquiriendo un comportamiento óptimo cuando se combina con Eudragit® L100-55 (P5). A partir de estos resultados, se descartaron las formulaciones P2, P3 y P6.

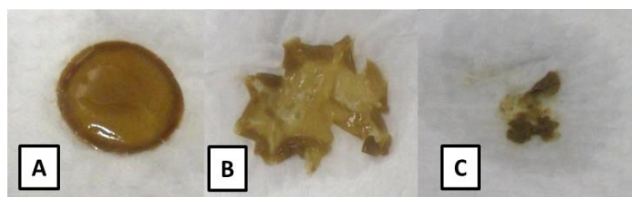


Figura 76. Películas al finalizar el ensayo de disolución. A) P2. B) P6. C) P4.

En la Tabla 25 se registra el tiempo en el que se produjo la máxima liberación de polifenoles, máxima cantidad liberada, tiempo que tardaron en disolverse las películas y el índice de humectación.

Tabla 25. Parámetros obtenidos a partir de la prueba de liberación

Fórmula	t _{max} (minutos)	% _{max}	t _{disolución} (minutos)	%Índice de Humectación (a 30 segundos)
P1	60-90	90-100	80	89
P2	15	47	No*	10
P3	6-7	99	10	54
P4	90	60	No**	60
P5	60-120	83-100	120	71
P6	20	79	No*	49

t_{máx}= Tiempo en que alcanza el máximo porcentaje liberado de polifenoles

%_{máx}= máxima concentración de polifenoles que libera en el tiempo T_{máx}.

t_{disolución}= tiempo al que se disuelven las películas.

* Se hinchan y expanden pero no se disuelven.

**Las películas no se disuelven pero se rompen y quedan fracciones en suspensión.

Con intención de lograr una película más homogénea en su espesor, se decidió que la plantilla de silicona no era un molde apropiado y sólo se trabajaría con las películas obtenidas en placas de Petri, con tamaño de 90 mm de diámetro. Estas películas ser cortaron con bisturí en tiras pequeñas de 10 mm de ancho por 20 mm de largo. Estas tiras fueron tomadas para las posteriores evaluaciones.

Al cambiar de molde se logró obtener películas más homogéneas en su espesor y peso.



Figura 77. Comparación de tiras reactivas de los film en la medición de pH, de P1 (B), P4 (C) y P5 (D), con los colores de referencia (A).

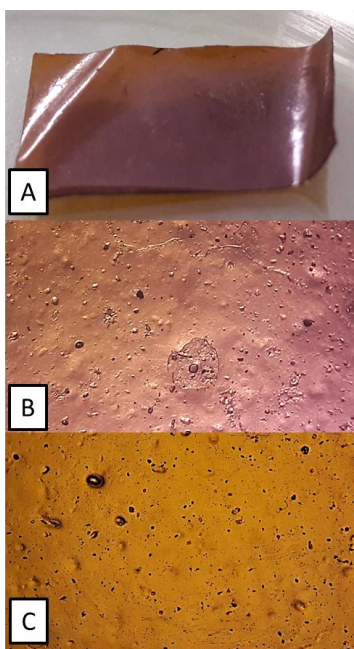


Figura 78. Película 1 observada a simple vista (A), con lupa binocular (B) y con microscopio óptico, aumento 4x (C).

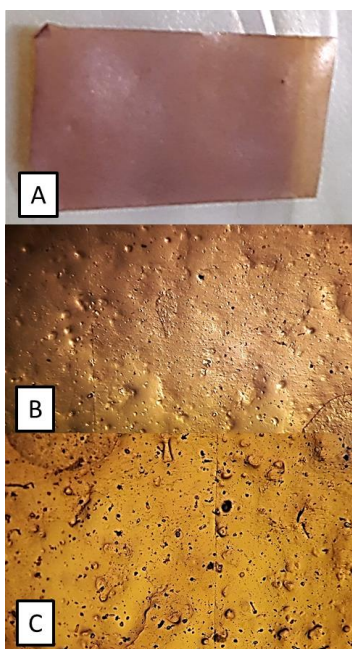


Figura 79. Película 4 observada a simple vista (A), con lupa binocular (B) y con microscopio óptico, aumento 4x (C).

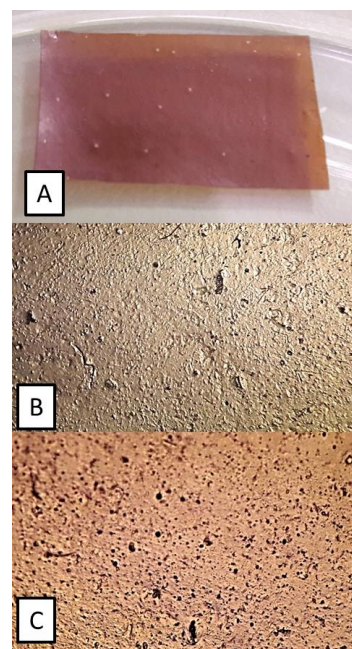


Figura 80. Película 5 observada a simple vista (A), con lupa binocular (B) y con microscopio óptico, aumento 4x (C).

En la tabla 26 se presentan los principales parámetros considerados en la caracterización físico-química y mecánica de las películas.

Las películas moldeadas en placas de Petri resultaron de color marrón, con aspecto homogéneo y de superficie brillante, inodoras, con sabor dulce y característico de los extractos vegetales.

5. Resultados y discusión

Tabla 26. Principales características y propiedades evaluadas en las películas.

Parámetros	P1	P4	P5
Peso (mg)	22,30 ± 0,56	24,40 ± 1,13	22,05 ± 0,07
Espesor (µm)	90,00 ± 7,00	83,40 ± 3,60	83,70 ± 9,74
Rotura por doblamiento	No quebró	No quebró	No quebró
pH de la superficie	6	6	6
Contenido de polifenoles (µg EAG/ película)	1.333,50 ± 142,26	1.217,56 ± 98,15	1.223,67 ± 181,27
Contenido de humedad (%)	0,36 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,30 ± 0,01
Índice de hidratación (%)	185,89 ± 14,22	247,45 ± 16,86	299,43 ± 42,85
Fuerza de desprendimiento (N)	0,46 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,70 ± 0,03
Fuerza/trabajo de adhesión (mJ)	0,77 ± 0,11	0,13 ± 0,01	1,324 ± 0,05
Fuerza de tensión (N/mm ²)	15,91 ± 3,02 ^b	8,9 ± 1,13 ^a	7,07 ± 2,40 ^a
Módulo de Young (N/mm ²)	2,15 ± 0,66 ^b	0,47 ± 0,19 ^a	0,12 ± 0,04 ^a
Elongación hasta rotura (%)	46,99 ± 9,29 ^a	79,42 ± 21,24 ^{a,b}	97,80 ± 28,76 ^b

El contenido de polifenoles en las películas recién elaboradas estuvo comprendido entre 1217,56 ± 98,15 y 1.333,50 ± 142,26 µg EAG, lo que representa entre un 97 y 106 % de acuerdo a lo esperado; la diferencia entre ellas no fue significativa. Este valor representa más del doble de la CIM hallada para la combinación de extractos.

Las películas tienen un valor de pH de 6, y se considera aceptable para el sitio de aplicación. Lograr mantener un pH cercano a la neutralidad en una formulación bucal es importante porque de lo contrario podría generar irritación. Otras películas para aplicación bucal se han informado con valores de pH entre 5,6 y 6,5 (K. R. Patel, Patel, Mehta, Patel, & Patel, 2011) y 6,5-7,2 (Avachat et al., 2013).

El espesor estuvo comprendido entre 83,4 ± 3,60 y 90 ± 7 µm. Podrían considerarse delgadas en comparación con otras películas donde el espesor informado se ha encontrado en el rango de 145-459 µm (Asnani & Parashar, 2011; Avachat, Gujar, & Wagh, 2013; Chantasart et al., 2017; Febriyenti et al., 2014; K. R. Patel et al., 2011). A pesar de esto, su delgadez no las hizo más frágil, fue fácil manipularlas, vehiculizaron 2,4 veces el valor de la CIM.

Propiedades mecánicas

El ensayo de tensión da una idea de la dureza y elasticidad de las películas, reflejadas por los parámetros: fuerza de tensión, módulo elástico o módulo de Young y elongación hasta la ruptura (tabla 26).

La fuerza de tensión de las películas estuvo comprendida entre 7,07 ± 2,40 y 15,91 ± 3,02 N/mm², siendo mayor para la película elaborada solo con HPMC (P1). Se encontraron diferencias

significativas entre las películas de HPMC con aquellas que combinan HPMC y Eudragit®. Se encontró que la incorporación de los Eudragit® a las películas disminuye la fuerza de tensión y el módulo de Young, pero aumenta la elongación hasta la ruptura. Lo que indica que se obtienen películas elásticas, flexibles y más blandas. Un fenómeno similar pudo observarse en otro estudio, cuando el agregado de ácido poliacrílico (Carbopol®) a películas de HPMC redujo la resistencia y aumentó la suavidad, elasticidad y flexibilidad (Peh & Wong, 1999).

Trabajos donde estudiaron las propiedades mecánicas de películas bucales elaboradas con HPMC informaron fuerzas de tensión de entre 1 y 8,94 N/mm² (Chantasart et al., 2017; Febriyenti et al., 2014), y de entre 1,09 y 10,7 Kg/mm² (Asnani y Parashar, 2011; Patel et al., 2011; Peh y Wong, 1999). La dureza o fragilidad de las películas dependerá del tipo y concentración de polímero y plastificante empleado, encontrándose una amplia variedad de resultados.

El módulo de Young estuvo comprendido entre 0,12 ± 0,04 y 2,15 ± 0,66 N/mm², siendo la película elaborada con HPMC nuevamente la que posee el mayor valor. El rango informado para películas con HPMC, sola y en combinación con otros polímeros, ha sido 1,42-9 Kg/mm² (Chantasart et al., 2017; Febriyenti et al., 2014), y 3,26 y 64,64 Kg/mm² (Peh & Wong, 1999). Con polímeros de Eudragit® se informaron módulos elásticos de entre 25 y 100 Kg/mm² (Asnani & Parashar, 2011), valores muy por encima de los obtenidos en este trabajo. La disminución del módulo de Young al combinarse HPMC con los polímeros de Eudragit® se interpreta como una disminución en la rigidez de la película.

En cuanto al porcentaje de elongación hasta la ruptura, se encontró que las películas de HPMC presentaron el menor valor (46,99 ± 9,29 %) y las películas que contiene la combinación de HPMC y Eudragit® L100 presentaron el mayor valor (79,42 ± 21,24). Los cuales se encuentran dentro del rango de los valores publicados por otros trabajos 8,92-339 % (Asnani & Parashar, 2011; Febriyenti et al., 2014; K. R. Patel et al., 2011; Peh & Wong, 1999). Las películas estudiadas en esta tesis presentaron un porcentaje de elongación hasta la ruptura adecuado, porque no son tan elásticas pero tampoco tan frágiles como para romperse al ser dobladas con las manos.

De acuerdo con Peh y Wong (1999), se pueden obtener los tipos de películas que se indican en la tabla 27, según el valor obtenido para las propiedades mecánicas mencionadas previamente. Ellos también sugieren que una película bucal adecuada debiera tener una fuerza de tensión y elongación a la ruptura relativamente altos, y un módulo elástico bajo.

Teniendo en cuenta éstos criterios, P1 se clasifica como dura y resistente, mientras que P4 y P5 serían blandas y elásticas. Todas fueron fáciles de manipular y no se quebraron fácilmente.

Tabla 27. Tipos de películas de acuerdo a las propiedades mecánicas determinadas experimentalmente.

Tipo de película	Fuerza de tensión	Módulo de Young	Elongación hasta la ruptura
Blanda y débil	Bajo	Bajo	Bajo
Dura y quebradiza	Moderado	Alto	Bajo
Suave y resistente	Moderado	Bajo	Alto
Dura y resistente	Alto	Alto	Alto

Mucoadhesividad

La mucoadhesión es un proceso complejo y se han presentado numerosas teorías para explicar los mecanismos involucrados. Estas teorías incluyen procesos de interconexión mecánica, electrostática, difusión-interpenetración, adsorción y fractura, mientras que sin duda las teorías más ampliamente aceptadas se basan en la termodinámica de la energía superficial y la interpenetración/difusión. La teoría de la humectabilidad es principalmente aplicable a sistemas mucoadhesivos líquidos o de baja viscosidad y es esencialmente una medida de la capacidad de esparcimiento del sistema de administración de fármacos a través del sustrato biológico

El estado de hinchamiento del polímero es crucial para un comportamiento bioadhesivo. La adherencia ocurre poco después del comienzo de la hinchazón, pero el enlace que se forma no es muy fuerte. La adhesión aumentará con el grado de hidratación hasta un punto en el que la sobre-hidratación provoque una caída abrupta de la resistencia del adhesivo debido al desenredado en la interfaz polímero-tejido (Peh & Wong, 1999).

Los polímeros con alto índice de hidratación poseen mayor fuerza de adhesión a los tejidos (Avachat, Gujar & Wagh, 2013). Este comportamiento se puede observar en las películas estudiadas, siendo P1 la que posee menor índice de hidratación y menor fuerza de adhesión, mientras que P5 posee mayor índice de hidratación y mayor fuerza de adhesión.

Aunque P4 posee un índice de hidratación intermedio es la que presenta menor fuerza de adhesión y menor fuerza de desprendimiento, es decir, es la película menos adhesiva. La más adhesiva resultó ser P5. La incorporación de Eudragit® L 100 produjo un descenso del trabajo de adhesión y fuerza de desprendimiento a casi el 50% del valor obtenido para las películas que contienen sólo HPMC, mientras que el agregado de Eudragit® L100-55 produjo el efecto opuesto, aumentando estos parámetros a casi el doble de los obtenidos con P1. Este comportamiento podría deberse al hecho de que Eudragit® L100-55 es un copolímero aniónico, la presencia de

esas cargas favorecerían la interacción con el epitelio generando atracción entre el polímero y la mucosa, haciendo a la película más mucoadhesiva, mientras que Eudragit® L100 al ser un polímero neutro, no ejercería alguna atracción con la mucosa y disminuiría las interacciones de atracción que podrían generarse entre la mucosa y las cadenas de HPMC. Estos resultados están de acuerdo con Díaz et al. (2003), quienes explican que cuando a la HPMC se le añade una sustancia polimérica no iónica se produce un cierto grado de entrecruzamiento entre las cadenas hidrofóbicas de HPMC y el polímero añadido, tal reestructuración se debería a interacciones débiles del tipo Van der Waals o puentes de hidrógeno y se manifiesta en una menor fuerza de cohesión y adhesión.

Índice de humectación

El índice de humectación estuvo comprendido entre $185,89 \pm 14,22$ y $299,43 \pm 42,85\%$, siendo las películas sólo de HPMC las que presentaron el menor valor. El agregado de Eudragit® a la formulación produjo un aumento en el índice de hidratación, logrando el máximo valor a los 30 segundos, luego comenzaron a disolverse.

Peh y Wong (1999), encontraron que en películas de HPMC disminuyó el índice de hidratación cuando se agregó poliacrilato en distintas proporciones, alcanzando el máximo valor a los 20 minutos.

Las cargas a lo largo de un polímero facilitan la entrada de agua en cantidad suficiente para provocar la hidratación y el hinchamiento (Vallejo Díaz & Perilla, 2008). HPMC es un polímero no iónico, posee grupos no polares a lo largo de la cadena, pero la presencia de oxidrilos (polar) podría favorecer la hidratación e incorporación de agua en su red. Eudragit® L 100-55 al ser aniónico podría favorecer la atracción de moléculas de agua hacia las cadenas acelerando el proceso de hidratación, y Eudragit® L100 no es soluble en agua, y no favorece la hidratación porque no presenta cargas iónicas en su estructura, pero posee alta permeabilidad al agua.

5.9.2 Liberación de polifenoles desde las películas

Las formulaciones seleccionadas, nuevamente preparadas y moldeadas en placas de Petri, cortadas en tiras de 10 x 20 mm fueron sometidas una vez más al estudio de liberación de polifenoles. Se observaron diferencias entre los perfiles de liberación de P4 y P5 obtenidos con las películas moldeadas en silicona y en placas de Petri. Esto puede relacionarse con un espesor uniforme logrado en estos nuevos moldes, lo que modifica la forma en que se produce la hidratación y posterior liberación.

La capacidad de hidratación influye en el proceso de liberación, por lo que cabe esperar que sea P5 la que libera más rápido el extracto y P1 lo haga de una forma más lenta. Este comportamiento es el que se obtuvo experimentalmente y se puede observar en la Figura 81.

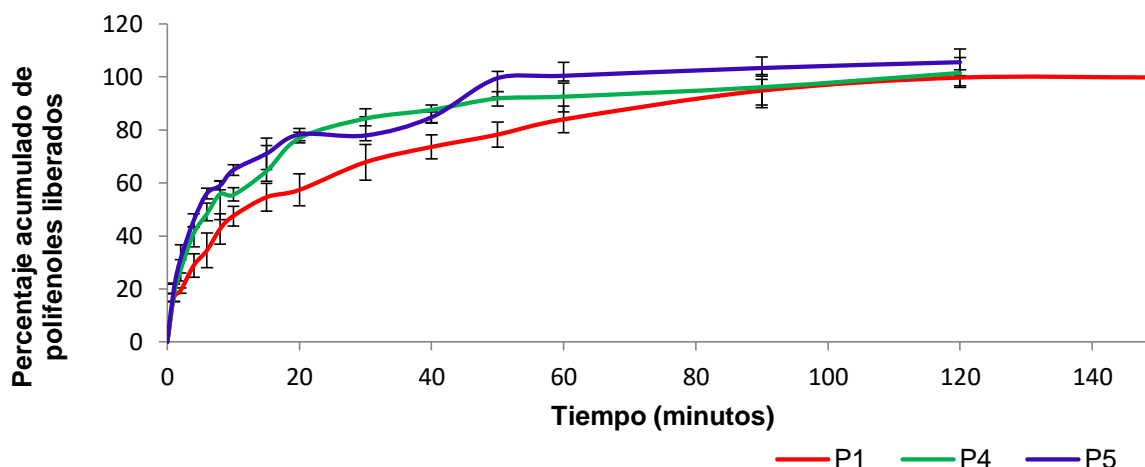


Figura 81. Cinética de liberación de polifenoles desde las películas seleccionadas.

Se trabajó con el complemento DDSolver para evaluar a qué modelo matemático se ajustan mejor los perfiles de liberación. Se ajustaron las medias de los perfiles de liberación con las ecuaciones propuestas para los modelos de primer orden, orden cero, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin. Para todas las formulaciones, el modelo Peppas-Sahlin fue el que proporcionó mejor descripción de los datos experimentales, con valores de R^2_{ajustado} (coeficiente de correlación lineal ajustado) entre 0,95 y 0,98 (ver tabla 28).

Tabla 28. Valor de R^2 y R^2_{ajustado} para los distintos modelos matemáticos.

Modelo cinético	Regresión lineal	P1	P4	P5
Orden cero	R^2	0,086	-0,469	0,600
	R^2_{ajustado}	0,086	-0,469	0,600
Primer orden	R^2	0,896	0,880	0,888
	R^2_{ajustado}	0,896	0,880	0,888
Higuchi	R^2	0,874	0,874	0,639
	R^2_{ajustado}	0,874	0,874	0,639
Korsmeyer-Pepas	R^2	0,962	0,846	0,828
	R^2_{ajustado}	0,959	0,835	0,814
Peppas-Sahlin	R^2	0,988	0,973	0,965
	R^2_{ajustado}	0,986	0,968	0,959

El valor de n calculado con el modelo de Peppas-Sahlin fue 0,45 en todos los casos, lo que indica la existencia de varios procesos simultáneos al fenómeno de difusión de ASA ($0,37 < n < 0,41$), además en este modelo no se tiene en cuenta la solubilidad que presentan estos fármacos. De acuerdo con Aragón Fernández et al., (2009) este resultado puede deberse, a que el proceso de formación de canales dentro del material es acompañado de la salida de aire ocluido en el interior de estas formulaciones, provocando la ruptura de segmentos de la matriz polimérica que debilitan la capacidad cohesiva de este material compuesto. Esto provoca que la mayor parte de la liberación se produzca a los 25 minutos del estudio, desintegrándose completamente a las 2 horas.

En el modelo de Peppas-Sahlin, los resultados de " n " fueron bastante similares a los señalados para muestras que oscilan entre 0,33 y 0,46 (Rigter & Peppas, 1987), que siguen un perfil de liberación similar al observado en los estudios de Vallet-Regi, Balas, & Arcos, (2007); donde gran cantidad del fármaco fue liberada rápidamente, seguida de una tasa de liberación más lenta. Este tipo de liberación puede ser útil cuando se desea utilizar una dosis de ataque, es decir, un efecto rápido, como, por ejemplo, el uso de antibiótico para combatir los brotes infecciosos o la utilización de anestésicos locales para aliviar el dolor agudo postoperatorio.

Tabla 29. Parámetros de la cinética de liberación para la ecuación de Peppas-Sahlin.

Parámetros	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Media	DE	RSD(%)
<i>Película 1</i>						
k1	16,0171	17,6311	18,0605	17,2362	1,0774	6,2509
k2	-0,5258	-0,7976	-0,7271	-0,6835	0,1411	-20,6372
n	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,0000	0,0000
<i>Película 4</i>						
k1	23,5502	25,6749	25,6845	24,6738	1,1655	4,7236
k2	-1,4903	-1,6925	-1,5753	-1,5268	0,1447	-9,4754
n	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,0000	0,0000
<i>Película 5</i>						
k1	26,6615	26,7261	25,3527	26,2468	0,7749	2,9525
k2	-1,6655	-1,7956	-1,5013	-1,6541	0,1475	-8,9154
n	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,0000	0,0000

Los valores de K_1 mayores a los valores de K_2 (tabla 29) indican que la liberación se debe principalmente por la difusión de los polifenoles a través de la matriz hidratada de la película.

En las figuras 82, 83 y 84 se muestran los perfiles de liberación analizados, donde la línea roja representa la curva predicha de acuerdo al modelo de Peppas-Shalin y los puntos azules los valores obtenidos experimentalmente en cada tiempo de muestreo.

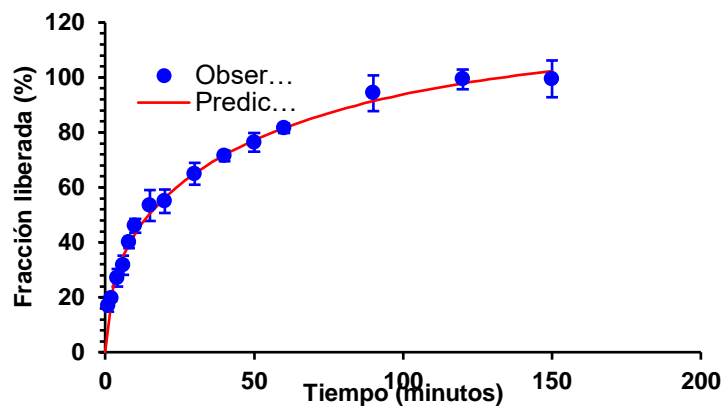


Figura 82. Ajuste del perfil de liberación de los polifenoles en la película 1 al modelo de Peppas-Sahlin.

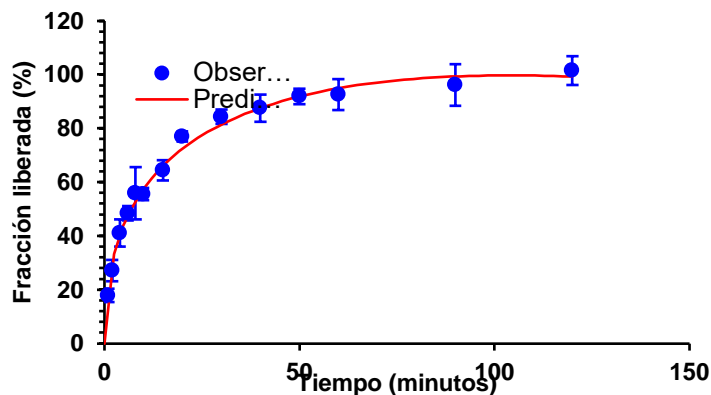


Figura 83. Ajuste del perfil de liberación de los polifenoles en la película 4 al modelo de Peppas-Sahlin.

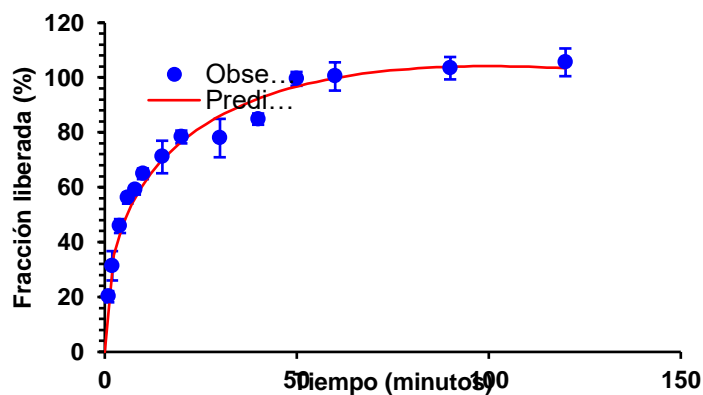


Figura 84. Ajuste del perfil de liberación de los polifenoles en la película 5 al modelo de Peppas-Sahlin.

5.9.3 Efecto antimicrobiano

Técnica en medio sólido

Los resultados para esta prueba fueron negativos, pues no se observaron halos de inhibición, probablemente por la pobre hidratación de las películas sobre el agar, por lo que esto dificulta la liberación de los principios activos y difusión a través del agar. Debido a ello, se decidió evaluar la actividad antimicrobiana en medio líquido.

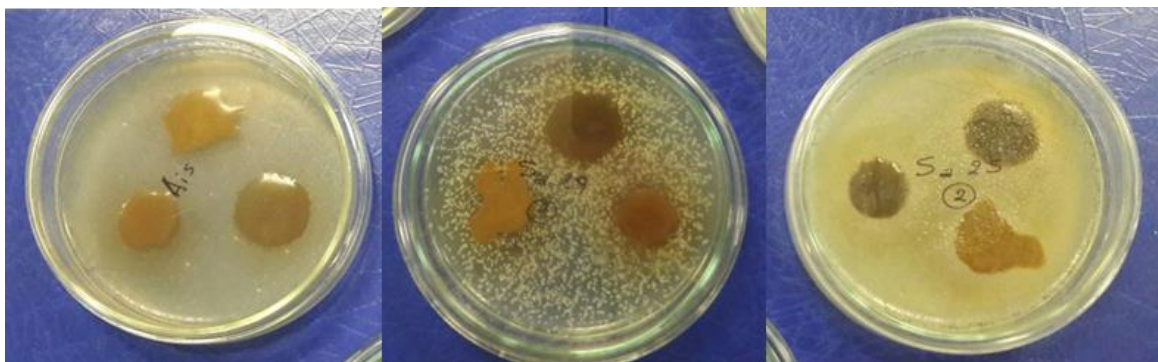


Figura 85. Placas de Petri luego de 24hs de incubación, con distintas cepas de *S. aureus* y las películas P1, P4 y P5 sobre el agar.

Técnica en medio líquido

Los resultados de este ensayo para *S. aureus* se presentan en términos de los cambios en \log_{10} de las unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml), en función del tiempo; esto se muestra en la Figura 86.

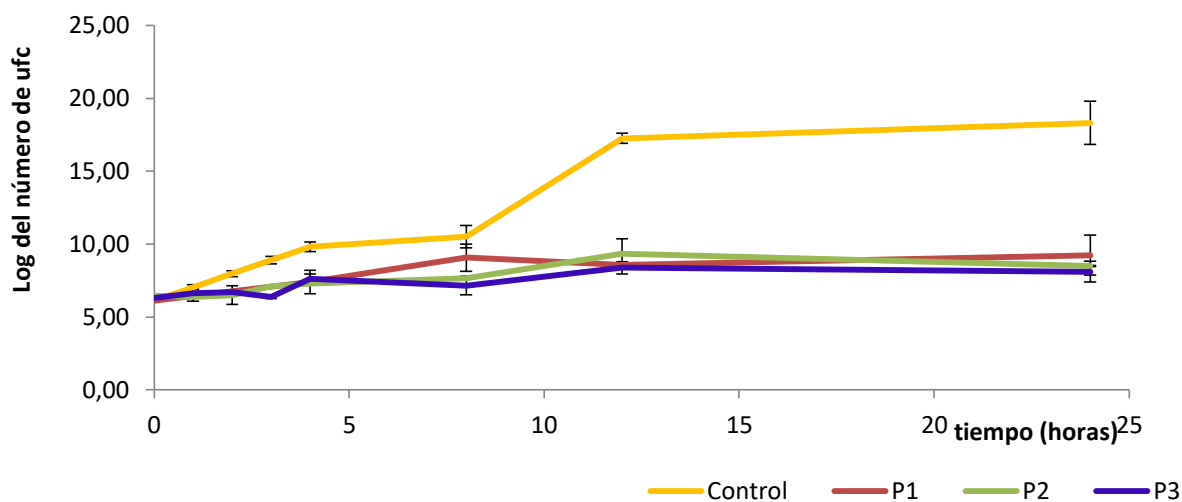


Figura 86. Cinética de inhibición del crecimiento bacteriano de las películas frente a *S. aureus* ATCC 25923.

5. Resultados y discusión

Esta técnica resultó la más apropiada para evaluar la actividad de las películas debido a que permite la hidratación de las mismas, lo que facilita la liberación del extracto y el contacto directo con los microorganismos ensayados.

A partir de las 4 horas, cada cultivo tratado con las películas presentó una inhibición significativa del crecimiento respecto del control ($p < 0,05$). El número de células viables se mantuvo sin diferencias significativas entre las 8 y 24 horas del ensayo. Al finalizar, se consiguió con las películas una disminución en el crecimiento bacteriano de 9 \log_{10} respecto del control, observándose un efecto bacteriostático. Todas las películas presentaron un efecto bacteriostático, porque el número de UFC/ml se mantuvo cercano al valor inicial. Al finalizar el ensayo hubo una diferencia en el crecimiento bacteriano entre 9,08 y 10,22 unidades logarítmicas con respecto al tubo control en el mismo tiempo de ensayo.

Tabla 30. Parámetros analizados en el estudio de cinética de inhibición del crecimiento bacteriano.

Tiempo	Log ₁₀ UFC/ml				Diferencia de unidades logarítmicas del control con las películas		
	Control	P1	P4	P5	P1	P4	P5
0	6,12 ± 0,04	6,11 ± 0,02	6,45 ± 0,03	6,31 ± 0,11	0,01	-0,33	-0,18
1	7,05 ± 0,15	6,41 ± 0,27	6,37 ± 0,28	6,65 ± 0,26	0,64	0,68	0,40
2	7,97 ± 0,21	6,55 ± 0,35	6,50 ± 0,65	6,70 ± 0	1,42	1,47	1,27
3	8,9 ± 0,27	7,12 ± 0,2	7,09 ± 0,07	6,39 ± 0,12	1,78	1,81	2,51
4	9,82 ± 0,53	7,39 ± 0,80	7,30 ± 0,03	7,61 ± 0,32	2,43	2,52	2,21
8	10,51 ± 0,78	9,07 ± 0,92	7,65 ± 0,07	7,15 ± 0,64	1,44	2,86	3,36
12	17,25 ± 0,35	8,56 ± 0,17	9,33 ± 1,03	8,37 ± 0,41	8,68	7,91	8,87
24	18,32 ± 1,47	9,24 ± 1,36	8,50 ± 0,03	8,10 ± 0,71	9,08	9,82	10,22

Como se explicó anteriormente en la sección 4.7.7 Determinación del poder antimicrobiano de los geles, el efecto bacteriostático podría deberse a la limitada solubilidad de los extractos contenidos en las películas, ya que los mismos no son solubles en agua; y en consecuencia no se logra alcanzar la concentración de polifenoles necesaria para generar una disminución en el número de células viables respecto del valor inicial. Esta limitación se evidenció por la formación de un precipitado en los tubos con medios de cultivo acuoso.

5.9.4 Permeación in vitro

Todas las películas presentaron un flujo de permeación similar, cantidad total permeada y coeficiente de permeación, sólo difieren en el tiempo de latencia requerido para iniciar la permeación. En la figura 87 se muestra el perfil de permeación de las 3 películas a través de la mucosa oral porcina, y en la tabla 31 se resumen los principales parámetros analizados en este test.

Tabla 31. Parámetros obtenidos a partir de la cinética de permeación de polifenoles.

Formulación	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	Cantidad permeada a las 6h (μg)	% Permeado	Retenido en mucosa (μg)	% de Retención	Kp (cm/h)
P1	$11,28 \pm 0,60$	$140,89 \pm 42,87$	10	$549,46 \pm 26,71$	38	0,0078
P4	$8,90 \pm 0,30$	$139,56 \pm 24,88$	10	$534,61 \pm 5,71$	41	0,0067
P5	$8,94 \pm 0,57$	$146,07 \pm 15,25$	13	$477,66 \pm 3,00$	43	0,0080

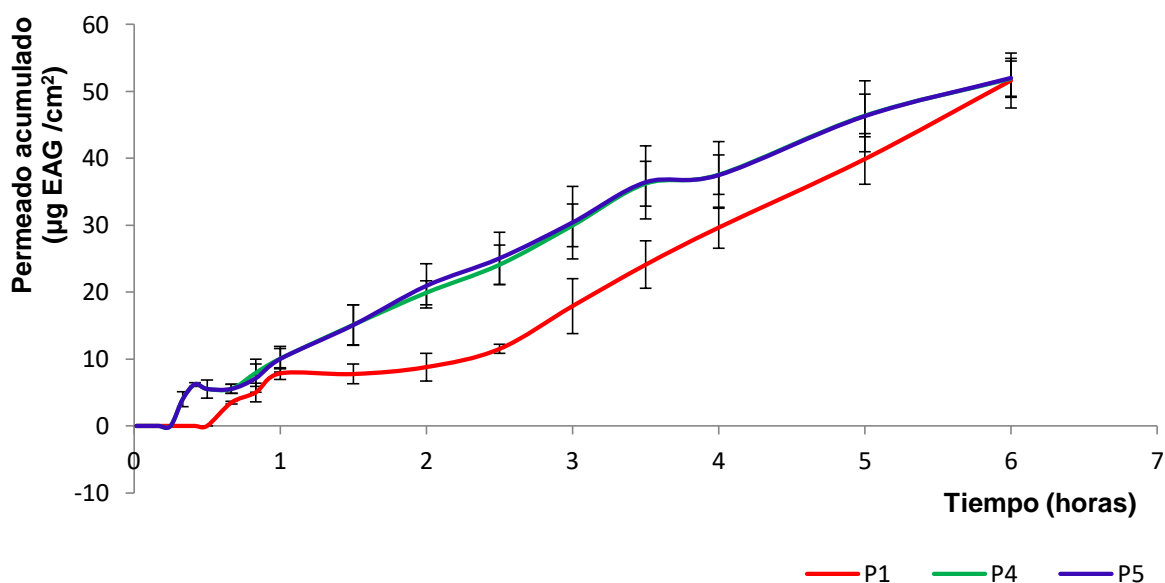


Figura 87. Cinética de permeación de polifenoles a través de mucosa oral porcina.

La capacidad de hidratación del polímero y la velocidad de liberación del extracto influirían en la velocidad de permeación transepitelial. A mayor capacidad de hidratación la liberación es más rápida y la permeación se ve favorecida. Si se comparan las curvas de permeación en función del tiempo y se tiene en cuenta el perfil de liberación y el índice de hidratación de las películas,

podemos observar para éstas películas que se cumple con el comportamiento esperado. Las películas P4 y P5 poseen mayor índice de hidratación que P1 y liberan el extracto más rápidamente que P1, por lo que logran atravesar el epitelio en menos tiempo. Sin embargo, una vez que el extracto proveniente de P1 logra atravesar el epitelio, se logra un flujo constante y lineal en el tiempo. Se obtuvo un flujo similar para las 3 formulaciones y sólo se diferenciaron en el período de latencia.

5.10 Evaluación de la estabilidad de las películas bucales

5.10.1 Estabilidad física en el tiempo

Se empleó papel manteca como medio soporte de las películas durante su almacenamiento, el cual se realizó en distintas condiciones de humedad y temperatura.

A los tres meses se notaron cambios importantes en el aspecto físico de las películas, lo que se consideró clave para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento.

A continuación se describen cómo se encontraron las películas luego de ese período en las distintas condiciones de almacenamiento.

Tabla 32. Característica de las películas conservadas a 0 % HR y temperatura ambiente (~25 °C).

Parámetro evaluado	P1	P4	P5
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Apariencia	Brillosa, rígida	Dura, seca, plástica	Rígida
Forma	Sin deformación importante	Se enrollan sobre sí mismas y se arrugan	Mantienen la forma plana
Resistencia al doblamiento	Quebradiza	Resistente	Quebradiza
Adhesividad al tacto	No	No	No

Tabla 33. Característica de las películas conservadas a 0 % HR y 8 °C.

Parámetro evaluado	P1	P4	P5
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Apariencia	Brillosa	Dura y plástica	Plástica
Forma	Conserva	Se enrollan sobre sí mismas y se arrugan	Conserva
Resistencia al doblamiento	Resistente	Quebradiza	Quebradiza
Adhesividad al tacto	No	No	No
Otras observaciones	No mancha el papel soporte	No mancha el papel soporte	No mancha el papel soporte

Tabla 34. Característica de las películas almacenadas a 58 % HR y 40 °C.

Parámetro evaluado	P1	P4	P5
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Apariencia	Rígida	Rígida	Rígida y opaca
Forma	Se arruga	Se enrollan sobre sí mismas	Se conserva
Comportamiento al doblarlos	Quebradiza	Quebradiza	Quebradiza
Adhesividad al tacto	No	No	No
Otras observaciones	Mancha el papel soporte	Mancha el papel soporte	Mancha el papel soporte y se adhiere a él

Las películas almacenadas a 0% HR y 40 °C no mancharon el papel soporte pero resultaron frágiles y quebradizas al manipularlas.

Tabla 35. Característica de las películas conservadas sin control de humedad y a temperatura ambiente (~25 °C).

Parámetro evaluado	P1	P4	P5
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Apariencia	Brillosa y rígida	Brillosa y blanda	Brillosa y rígida
Forma	Conserva	Conserva	Conserva
Comportamiento al doblarlos	Quebradiza	Quebradiza	Quebradiza
Adhesivo al tacto	Si	Si	Si

5. Resultados y discusión

Tabla 36. Característica de las películas conservadas a 58 % y temperatura ambiente (~25 %).

Parámetro evaluado	P1	P4	P5
Color	Marrón	Marrón	Marrón
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Apariencia	Opaca y blanda	Opaca y rígida	Opaca y rígida
Forma	Conserva	Conserva	Conserva
Comportamiento al doblarlos	Quebradiza	Quebradiza	Quebradiza
Adhesivo al tacto	No	No	No

Las películas almacenadas a 58 % HR y 8 °C resultaron con características similares a las indicadas en la tabla 36. Éstos datos no son presentados en tabla.

Caracteres organolépticos y apariencia general

Las películas al ser una forma farmacéutica deshidratada se ven afectadas tanto por la humedad como por la temperatura, cuando están expuestas a un ambiente seco y cálido se tornan quebradizas y frágiles; mientras que en un ambiente húmedo se tornan pegajosas y muy blandas, independientemente de la temperatura.

Las películas almacenadas en un recipiente hermético sin control de la humedad, mantuvieron un buen aspecto y no resultaron quebradizas. Estas películas retienen 0,41 % de agua, al parecer es la proporción de agua que estas formulaciones necesitan para tener un aspecto, textura y resistencia necesaria para ser manipuladas sin dificultad y agradables al tacto.

5.10.2 Estabilidad química en el tiempo

Polifenoles

El contenido de polifenoles totales en las películas al final del estudio de estabilidad se mantuvo entre el 70 y 123 % respecto del valor inicial.

Las películas más estables fueron las de HPMC (P1) y las de HPMC y Eudragit® L 100-55 (P5), a temperatura ambiente (27 °C), ya que la variación de humedad relativa no produjo cambios significativos en el tiempo.

La tabla 37 muestra las diferencias significativas para cada película cuando se comparan los valores de polifenoles obtenidos en distintas condiciones de humedad relativa y a temperatura constante. Según lo observado, cuando la temperatura es la misma pero varía la humedad, por lo general, se encuentran diferencias significativas en el contenido de polifenoles. En cambio, si se comparan los valores de polifenoles manteniendo constante la humedad (información no reflejada en la tabla 38), se encontró que las diferencias no son significativas para P1 cuando la HR es de

0% pero sí a 58 % HR. Las Películas 4 y 5 presentan diferencias significativas en todas las condiciones analizadas.

Tabla 37. Contenido de polifenoles (μg EAG/ película) a distintas condiciones de conservación.

Temperatura y Humedad relativa	Película		
	P1	P4	P5
<i>Conservados a temperatura ambiente</i>			
0 % HR	1324,89 \pm 73,70 ^a	1005,88 \pm 49,41 ^a	1155,83 \pm 54,49 ^a
58 % HR	1090,05 \pm 72,91 ^b	1138,67 \pm 33,02 ^b	1512,73 \pm 100,42 ^b
Sin Control de HR	1334,32 \pm 71,79 ^a	864,01 \pm 77,04 ^c	1262,30 \pm 61,72 ^a
<i>Conservados a 8 °C</i>			
0 % HR	1244,48 \pm 81,50 ^a	1034,30 \pm 16,39 ^a	1136,12 \pm 32,00 ^a
58 % HR	1186,91 \pm 49,84 ^a	917,11 \pm 20,84 ^b	1158,48 \pm 30,90 ^a
<i>Conservados a 40 °C</i>			
0 % HR	1324,20 \pm 73,88 ^a	997,40 \pm 23,42 ^a	1118,47 \pm 31,36 ^a
58 % HR	1448,00 \pm 54,57 ^a	1105,59 \pm 18,80 ^b	1231,00 \pm 30,21 ^b

Un análisis de la varianza de dos factores demostró que en general, tanto la temperatura como la humedad influyen sobre la concentración de polifenoles. La película que se ha visto menos afectada ante las distintas condiciones de almacenamiento es P1.

En cuanto a las películas que se almacenaron a temperatura ambiente sin control de humedad, el contenido de polifenoles no varió significativamente de aquellos que poseían una HR de 0 % pero sí de las que estuvieron a 58 % HR.

Estos valores indican que las condiciones más apropiadas para almacenar las películas serían 0 % HR y temperatura igual o inferior a 27 °C, es decir, en ambiente seco y fresco.

5.11 Control higiénico en el tiempo

Las películas cumplen con los criterios establecidos por la FA7 (2003). No se ha observado contaminación en el tiempo estudiado. Las películas son formas farmacéuticas deshidratadas y la ausencia de agua evita el desarrollo de microorganismo. Este factor favorece la estabilidad desde este aspecto. Y como se mencionó antes, para el control higiénico de geles, la tendencia es disminuir el uso de conservantes sintéticos, tanto por sus posibles efectos alérgicos y

5. Resultados y discusión

ambientales, y la percepción de la sociedad en general de que *todo lo natural es mejor*. Aunque eso puede ser discutible.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró el desarrollo de formulaciones que incluyeron una combinación de extractos vegetales. Para llegar a este producto fue necesario el reconocimiento de la composición química general de ambas plantas, la especie *Lippia turbinata* corresponde al quimiotipo limoneno y la especie *Lippia alba* corresponde al quimiotipo citral. El extracto hidroalcohólico de *L. turbinata* tuvo resultados positivos para la presencia de taninos y antraquinonas, el extracto hidroalcohólico de *L. alba* presentó los mismos grupos químicos y además se detectó la presencia de flavonoides. Ambos extractos fueron ricos en polifenoles.

En relación con la actividad biológica de los extractos, se pudo comprobar buena actividad antimicrobiana frente a las cepas *Staphylococcus* ensayadas, la cual se mantiene cuando se combinan sin que ocurra una interacción antagónica. Los extractos presentan actividad antiinflamatoria moderada la cual se vio potenciada cuando se combinaron ambos extractos, evidenciándose por la disminución del valor de CI_{50} .

El desarrollo de dos tipos de sistemas dispersos (geles y emulsiones) permitió reconocer que los geles evaluados pueden vehiculizar la combinación de extractos con los excipientes probados, pero es necesario incorporar un tensioactivo o cosolvente para lograr su inclusión. El uso de gelificantes emulsionados facilita el proceso de vehiculización. En cambio los extractos no se incorporan adecuadamente a emulsiones empleando como fase oleosa Ceral PW, Ceral 10, alcohol cetílico/estearílico o una mezcla de ambos, independientemente del procedimiento utilizado. La incorporación de un gelificante a la emulsión no logra la estabilidad física del preparado.

En la caracterización de los geles pudo demostrarse que presentan una textura y consistencia variable que depende del tipo y concentración de polímero empleado. En general son de color marrón, con olor característico de las especies vegetales, con pH neutro o levemente ácido. La inclusión del extracto afecta significativamente la estructura de gel. La fórmula de gel más adecuada fue F9, que contiene Sepigel® 4 %. Los geles no presentaron contaminación microbiana durante 18 meses.

El desarrollo de películas poliméricas fue otro sistema probado y los extractos pudieron ser formulados exitosamente en una película delgada para aplicación bucal. No todos los polímeros de Eudragit® son adecuados para elaborar una película de aplicación bucal. De los polímeros empleados, HPMC ha sido el que permitió formar películas con características agradables y apropiadas para el uso propuesto.

6. Conclusiones

En la caracterización se verificó que las películas presentan mejor aspecto a menor concentración de polímero. Es necesario emplear altas concentraciones de plastificante para lograr películas flexibles. El molde de las películas es un factor clave para lograr espesores homogéneos. Todas las películas fueron marrones, con sabor característico de las especies vegetales y dulce debido al agregado de la sacarina, su sabor es agradable. Las condiciones de almacenamiento afectan a las películas, se recomienda almacenarlas en un ambiente seco y fresco. Las formulaciones no presentaron contaminación microbiana durante 24 meses, a pesar de no contener agente conservante antimicrobiano. La película que presentó mejores características fue P1, elaborada con HPMC 1%.

En relación con la actividad antimicrobiana probada en las formulaciones, puede decirse que tanto los geles como las películas mantuvieron su bioactividad en el tiempo, mostrando efecto bacteriostático.

De acuerdo a los resultados logrados en el desarrollo de estas formas farmacéuticas, puede decirse que tanto los geles como las películas resultan formulaciones viables para vehiculizar extractos vegetales con los excipientes seleccionados y las metodologías descritas a escala laboratorio.

Estos resultados pueden trasladarse a la vehiculización de otros extractos vegetales con propiedades medicinales y ser preparados en otros laboratorios de productos naturales o incluso en farmacias magistrales.

Cabe destacar también, que son necesarios métodos estandarizados para la caracterización de películas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Al finalizar esta etapa de investigación a partir de productos naturales con extractos hidroalcohólicos se logró una experiencia positiva con la combinación de dos extractos a partir de especies que pueden cultivarse en jardines y huertas.

Las actividades biológicas evaluadas fueron la acción antibacteriana y la antiinflamatoria. Debido a los antecedentes hallados en el estado de arte actual, consideramos que es posible hallar resultados interesantes generando otras combinaciones de componentes activos con los extractos. Por eso se pretende evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos vegetales y sus aceites esenciales cuando se combinan con antibióticos. También es necesario evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos con ensayos *in vivo*.

En lo relacionado con el desarrollo de formulaciones, aún es posible seguir el estudio de nuevas fórmulas de películas para lograr una liberación prolongada en el tiempo o de ser necesario alcanzar un efecto controlado.

De acuerdo a lo observado con el contenido de fenoles totales en las formulaciones, es de interés estudiar el comportamiento químico de los polifenoles en condiciones de estabilidad acelerada. En este caso es necesario identificar qué cambios podrían sufrir los componentes del extracto, que moléculas podrían aparecer a temperaturas más elevadas, de modo de aproximarnos a justificar el aumento de la reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu. Los cambios químicos podrían explicar el aumento del contenido de polifenoles en geles con derivados de celulosa.

Finalmente, es necesario continuar con el estudio de vehiculización de extractos hidroalcohólicos en formulaciones dermo-cosméticas diferentes de los geles y cremas o emulsiones como los ensayados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, P., Baajpaye, M., & Singh, S. P. (2012). Formulation and Evaluation of Herbal Gel Containing Boswellia Serrata , Curcuma Longa Extract and Oil of Wintergreen for Rheumatoid Arthritis. *International Bulletin of Drug Research*, 2(3), 31–40.
- Agudelo-Gomez, L. S., Gómez Ríos, G. A., Durán García, D. C., Stashenko, E., & Betancur-Galvis, L. (2010). Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown y sus componentes mayoritarios. *Salud UIS*, 42, 230–239.
- Aguiar, J. S., Costa, M. C. C. D., Nascimento, S. C., & Sena, K. X. F. R. (2008). Atividade antimicrobiana de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 436–440.
- Ajazuddin, Alexander, A., Khichariya, A., Gupta, S., Patel, R. J., Giri, T. K., & Tripathi, D. K. (2013). Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.030>
- Akula, U. S., & Odhav, B. (2008). In vitro 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *Journal of Medicinal Plant Research*, 2(9), 207–212.
- Alicante., C. de F. de la P. de. (2002). *Monografías Farmacéuticas* (Reedición). Alicante, España: Gráficas Olmedilla.
- Alviano, W. S., Alviano, D. S., Diniz, C. G., Antonioli, A. R., Alviano, C. S., Farias, L. M., ... Bolognese, A. M. (2008). In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*, 53(6), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>
- Amit, S., Saraswati, B., Kamalesh, U., & Kumud, U. (2013). Formulation and Evaluation of a Novel Herbal Gel of Equisetum arvense Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5), 80–86.
- ANMAT. Requisitos a cumplir por las empresas que soliciten ser reconocidas como representantes en el país de firmas titulares de Registros de Productos Farmacéuticos fabricados en otro Estado Parte del Mercosur (2002). Argentina. Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_3555-02.pdf
- Ansari, A. H., Islam, F., & Sameem, M. (2012). Influence of nanotechnology on herbal drugs: a

- review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 3(3), 142–146.
- ANVISA. (2011). *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (1ª edição). Brasília, Brasil: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Retrieved from www.anvisa.gov.br
- Aragón Fernández, J., González Santos, R., Brizuela Guerra, N., & Oliver Valdés, L. (2009). Estudi cinético de liberacion in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(6), 310–320.
- Aragüés, M., & González-Arriba, A. (2007). Infecciones cutáneas primarias por estafilococos y estreptococos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 98(Supl 1), 4–14. [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(07\)70176-X](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(07)70176-X)
- Aruna, M. S., Amani, N. S., Lakshmi, P. S., Sravani, A., Prabha, M. S., & Ramarao, N. (2014). Formulation and Evaluation of Herbal Anti Dandruff Gel. *Indo Amarecan Journal of Pharmaceutical Research*, 4(11), 5389–5393.
- Aslani, A., Zolfaghari, B., & Davoodvandi, F. (2016). Design, formulation and evaluation of an oral gel from Punica granatum flower extract for the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(3), 391–398. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.051>
- Asnani, A. J., & Parashar, V. V. (2011). Effect of different plasticizers on Eudragit RS100 and RL100 free film. *Der Pharmacia Lettre*, 3(2), 257–263.
- ASTM. (2002). *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting D 882* (No. D 882).
- Avachat, A. M., Gujar, K. N., & Wagh, K. V. (2013). Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.062>
- Bandoni, A. L. (2003). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Buenos Aires: CYTED.
- Barbosa, F. G., Lima, M. A. S., Braz-Filho, R., & Silveira, E. R. (2006). Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(11), 819–821.
- Bottignon, M. R., Rufino, E. R., Mayo Marquez, M. O., Colombo, C. A., de Azevedo Filho, J. A., Lourençao, A. L., ... Siqueira, W. J. (2011). Heterogeneity of linalool chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. N. Br., based on clonal half-sib progenies. *Scientia Agricola*, 68(4), 447–453.
- Cai, Y., Sun, C., & Corke, M. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional

- Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74, 2157–2184.
- Castelli, M., Cozzi, M., López, S., & Derita, M. (2009). Búsqueda de agentes conservantes a partir de productos naturales bioactivos. Retrieved from http://www.cfsf2.org.ar/upload/BUSQUEDA_DE_AGENTES_CONSERVANTES_A_PARTIR_DE_PRODUCTOS_Naturales_bioactivos.pdf
- Chantasart, D., Tocanitchart, P., Wongrakpanich, A., Teeranachaideekul, V., & Junyaprasert, V. B. (2017). Fabrication and evaluation of Eudragit ® polymeric films for transdermal delivery of piroxicam. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10837450.2017.1319864>
- Chaurasiya, N., & Chakraborty, G. S. (2014). Formulation and evaluation of herbal hydro gel from Hibiscus rosa-sinensis. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 6(1), 14–16.
- Chen, M. C., Huang, S. F., Lai, K. Y., & Ling, M. H. (2013). Fully embeddable chitosan microneedles as a sustained release depot for intradermal vaccination. *Biomaterials*, 34(12), 3077–3086. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.041>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32).
- CLSI. (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-7th Edition*. Document M7-A7. Wayne, PA (USA).
- CLSI. (2008). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Third Edition. Approved Standard. Document M27-A3. Wayne, PA (USA).
- Coll Aráoz, M. V., & Abdala, L. R. (2005). Caracterización preliminar de los flavonoides mayoritarios de Lippia turbinata Griseb, en una muestra recogida en Vipos (Argentina). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(4), 546–549.
- Colpo da Silva, J. C. (2017). *CIMENTOS ÓSSEOS ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E ALFA FOSFATO TRICÁLCICO DE DUPLA PEGA: DESENVOLVIMENTO/CARACTERIZAÇÃO PARA FINS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS E VIGILÂNCIA SANITÁRIA*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Conde, R., Correa, V. S. C., Carmona, F., Contini, S. H. T., & Pereira, A. M. S. (2011). Chemical composition and their therapeutic effects of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. *Phytomedicine*, 18, 1197–1201.

- Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Cuello, S., Torres, S., Pérez, J., ... Isla, M. I. (2016). Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry*, 190, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.068>
- Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., & Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 247–251.
- de la Cueva, P., & Herranz, J. M. (2007). Enfermedades ampollas. *Anales de Pediatría Continuada*, 5(6), 373–377. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(07\)74163-X](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(07)74163-X)
- Desmarchelier, C. (2012). Núcleo socio-productivo estratégico. FITOMEDICINA. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Presidencia de la Nación. Retrieved from <http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/wp-content/uploads/2013/03/Fitomedicina2016.pdf>
- Dias Costa, M. do C. C., Aguiar, J. dos S., & do Nascimento, S. C. (2004). Actividad citotóxica de extractos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(3), 349–352.
- Díaz, J., García, J., Claro, C., Ferrero, C., & Lucero, M. J. (2003). *Determinación de las propiedades mecánicas de sistemas poliméricos de HPMC y Eudragit®. VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG) 3ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica (AEFI). Libro de comunicaciones*. Granada: Ed. Comares, S.L. Retrieved from http://www.sefig.com/doc/Congreso Granada/TF/017_TF.pdf
- Díaz Ley, B., Heras Mendaza, F., & Conde-Salazar Gómez, L. (2006). Parabens: ¿Mito o realidad? *Piel*, 21(5), 231–240. [https://doi.org/10.1016/S0213-9251\(06\)72476-5](https://doi.org/10.1016/S0213-9251(06)72476-5)
- Dong, L., Liu, C., Cun, D., & Fang, L. (2015). The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 78, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.003>
- Dos Anjos, M. L. (2017). *Avaliação do processo de remoção de fármacos e parabens de esgoto doméstico em sistema de tratamento baseado em lagoas de lem*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE ENGENHARIA CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11449/148998>
- Duschatzky, C., Bailac, P., Firpo, P., & Ponzi, M. (1998). Composition of essential oils from *Lippia*

- juneliana, Lippia integrifolia, and Lippia turbinata from San Luis Province (Argentina). *Revista Colombiana de Química*, 27, 9–16.
- Dzoyem, J. P., & Eloff, J. N. (2014). Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 160(3), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.034>
- Echeverr -Z rate, J. (2008). Estado actual de la Resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, 47(4), 164–174. Retrieved from <http://www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/numeros/2008/oct-dic/164-174.html>
- Ezzat, S. M., Ezzat, M. I., Okba, M. M., Menze, E. T., & Abdel-Naim, A. B. (2018). The hidden mechanism beyond ginger (Zingiber officinale Rosc.) potent in vivo and in vitro anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 214, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.019>
- FabriQu mica. (n.d.). Cat logo de materias primas cos micas. Retrieved from http://www.fabriquimica.com/download/catalogo_fabriQUIMICA_es.pdf
- Fagin, A. P., Wax, M. K., & Petrisor, D. (2018). Advanced Buccal Mucosa Cancer. In *Oral, Head and Neck Oncology and Reconstructive Surgery* (pp. 544–559). St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26568-3.00026-9>
- Farfán Barrera, C., Oliva Hernández, B. E., & Jayes Reyes, P. G. (2012). Determinación de los flavonoides en seis plantas del género Lippia (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutr ceuticos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Farmacopea Nacional Argentina. Volumen I.* (2003) (Séptima Ed). Argentina: Ministerio de Salud. ANMAT. INAME.
- Farmacopea Nacional Argentina.* (1978) (Sexta Edic). Buenos Aires, Argentina: Imprenta del Congreso de la Nación.
- Febriyenti, Fitria, N., Mohtar, N., Umar, S., Noviza, D., Rineldi, S., ... Bai. (2014). Honey gel and film for burn wound. *International Journal of Drug Delivery*, 6(1), 1–7.
- Fefelova, N. A., Nurkeeva, Z. S., Mun, G. A., & Khutoryanskiy, V. V. (2007). Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2- (methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 339, 25–32.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.019>

- Fernández-Montes, E. A. (2005). *Técnicas y Procedimientos en Formulación Magistral Dermatológica*. España: EGRAF S.A.
- Folashade, O., Omoregie, H., & Ochogu, P. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101–112. <https://doi.org/10.5897/IJBC11.163>
- Frum, Y., & Viljoen, A. M. (2006). In vitro 5-lipoxygenase activity of three indigenous South African aromatic plants used in traditional healing and the stereospecific activity of limonene in the 5-lipoxygenase. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 831–839.
- Gaikwad, D. D., & Banerjee, S. K. (2013). Development and evaluation of herbal gel formulation of *Magnifera indica* linn extract. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 260–265.
- Garcia, L. S. (Ed.). (2007). *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Second). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Garzón Bello, I. J. (2009). *Estudio de Marcadores de Diferenciación Epitelial en Mucosa Oral Construida por Ingeniería Tisular*. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Retrieved from <http://hera.ugr.es/tesisugr/18276635.pdf>
- Garzón, M. de L., Tecante, A., Ramírez-Gilly, M., & Palacios, J. (2009). VISCOELASTIC BEHAVIOR OF SOLUTIONS AND HYDRATED TABLETS OF. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(3), 307–318.
- Gawai, A., Magar, S. K., Gaikwad, D. R., Biyani, K. R., College, A., Road, S., & S, D. B.-M. (2016). RESEARCH ARTICLE EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF POLYHERBAL GEL - A NOVEL HERBAL FORMULATION * Corresponding author, 2(2), 62–66.
- Gésime, J., Acevedo, A., & Lalaguna, F. (2009). Las mucinas salivales y sus implicaciones en la Reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(2). Retrieved from <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/2/art-27/>
- Gómes de Ferraris, M. E., & Campos Muñoz, A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental* (3ª edición). México, DF.: Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V.
- Gomes, S. V. F., Nogueira, P. C. L., & Moraes, V. R. S. (2011). Aspectos químicos e biológicos do

- género *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química*, 36(1), 64–77.
- González Álvarez, I., Cabrera Pérez, M. Á., & Bermejo Sanz, M. del V. (2015). *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- González Barrón, S., Jiménez Corona, M. E., Triana Estrada, J., Ureña Ciret, J. L., García Hernández, J., Carrillo Rocha, J., ... Tena Tamayo, C. (2003). Recomendaciones para mejorar la práctica Odontológica. *CONAMED*, 8(1), 29–38.
- Haag, G., Marín, G. H., Brignoles, P., M E Del Valle, M. E., Magarinos, M. C., & Debenedetti, S. L. (2014). Antimicrobial activity of Latin American medicinal plant extracts. *Journal of Science*, 4(2), 128–131.
- Haque, M., Singh, A. K., Maurya, S. K., & Seth, A. (2014). Formulation development, physico-chemical characterization and evaluation of anti-microbial activity of herbal tooth gel. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(3), 1279–1285.
- Hernández, N. E., Tereschuk, M. L., & Abdala, L. R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00295-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00295-6)
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., García Cortez, D. A., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–1031. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>
- Hoppe, A. C., & Castello Novo Pais, M. (2017). Evaluation of paraben toxicity in cosmetics. *Revinter*, 10(3), 49–70.
- IBODA. (n.d.). Instituto de Botánica Darwinion. Catálogo de Plantas Vasculares. Retrieved October 4, 2018, from <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/BuscarEspecies.asp>
- Iglesias Valera, C., Saderra Estellers, M., & García Arumí, A. M. (2015). Patología inflamatoria de la cavidad oral. In *Libro virtual de formación en otorrinolaringología*. Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Retrieved from <https://booksmedicos.org/libro-virtual-de-formacion-en-otorrinolaringologia-seorl/>
- Jadhav, V. D., Talele Swati, G., Bakliwal Akshada, A., & Chaudhari, G. N. (2015). Formulation and Evaluation of Herbal Gel Containing *Sesbania Grandiflora* (L.) Poir. Leaf Extract. *Journal of Pharmaceutical and BioSciences*, 3, 65–72.

- Jiménez-Aspee, F., Alberto, M. R., Quispe, C., del Pilar Caramantin Soriano, M., Theoduloz, C., Zampini, I. C., ... Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Anti-Inflammatory Activity of Copao (*Eulychnia Acida* Phil., Cactaceae) Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0468-7>
- Josef, E., Barat, K., Barsht, I., Zilberman, M., & Bianco-Peled, H. (2013). Composite hydrogels as a vehicle for releasing drugs with a wide range of hydrophobicities. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 8815–8822. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.028>
- Juliani, H. R., Koroch, A., Simon, J. E., Biurrun, F. N., Castellano, V., & Zygadlo, J. A. (2004). Essential oils from Argentinean aromatic plants. *Acta Horticulturae*, 629(Proc. XXVI IHC-Future for medicinal and aromatic plants), 491–498.
- Jyothi, D., & Koland, M. (2016). Formulation and evaluation of an herbal anti-inflammatory gel containing trigonella foenum greacum seed extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(1).
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., & Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119, 684–688.
- Karki, A. S., Kim, H., Na, S., Shin, D., Jo, K., & Lee, J. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 559–574. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>
- Koohsari, H., Ghaemi, E. A., Poli Shesh, M. S., & Sadegh, A. (2013). Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (*Lippia citriodora*) leaves. *Scholars Research Library*, 4(10), 52–55. Retrieved from <http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/evaluation-of-antibacterial-activity-of-lemon-verbena-lippiacitriodora-leaves.pdf>
- Krampe, R., Visser, J. C., Frijlink, H. W., Breitzkreutz, J., Woerdenbag, H. J., & Preis, M. (2015). Oromucosal film preparations: points to consider for patient centricity and manufacturing processes. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(4), 493–506. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1118048>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazmin, Z. C. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_037
- Lozano, M. del C., Córdoba, D., & Córdoba, M. (2012). *Manual de tecnología farmacéutica*. Barcelona, España: Fotoletra S.A.

- Mamidi, S. A., Priya, N. S., Avula, S., Bhavani, B., Gopi, chand U., Fathima, S. K., & Nadendla, R. (2015). Formulation and evaluation of a wound healing gel containing *Syzygium cumini* leaf extract. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research*, 6(4), 82–87.
- Marcano, M. E., & González, F. (2006). Barrera cutánea. *Dermatología Venezolana*, 44(2), 5–12.
- Marks, J. G., Miller, J. J., Marks, J. G., & Miller, J. J. (2019). Structure and Function of the Skin. In *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology* (pp. 2–10). US: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43040-1.00002-6>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271–278. Retrieved from <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
- Martínez, M. (2016). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la aministración y liberación modificada de fármacos*. Universidad de Valencia. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/75989612.pdf>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. *Food Chemistry*, 167, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094>
- Meher Gopal, J., Tarai, M., Yadav, N. P., Patnaik, A., Mishra, P., & Singh Yadav, K. (2013). Development and characterization of cellulose – polymethacrylate mucoadhesive film for buccal delivery of carvedilol. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.076>
- Mignet, N., Seguin, J., & Chabot, G. G. (2013). Bioavailability of polyphenol liposomes: a challenge ahead. *Pharmaceutics*, 5(3), 457–471.
- Millet, C. R., Halpern, A. V, Rebolí, A. C., & Heymann, W. R. (2016). Enfermedades bacterianas. In J. L. Bolognia, J. L. Jorizzo, & J. V Schaffer (Eds.), *Dermatología. Principales diagnósticos y tratamientos* (pp. 285–318). Barcelona, España: Elsevier Ltd.
- Ministerio de Salud de la Nación, M., Administración Nacional de Medicamento Alimento y

8. Referencias bibliográficas

- Tecnología Médica, A., & Instituto Nacional de Medicamentos, I. (2007). *Farmacopea Argentina. Volumen I* (Séptima Ed). Buenos Aires, Argentina: Imprenta del Congreso de la Nación.
- Mohammed, M., & Osman, W. (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(4), 275–285. Retrieved from http://www.phytopharmajournal.com/Vol3_Issue4_09.pdf
- Mohan, C. G., Deepak, M., Viswanatha, G. L., Savinay, G., Hanumantharaju, V., Rajendra, C. E., & Halemani, P. D. (2013). Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of leaf extracts and fractions of *Mangifera indica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(4), 311–314. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60062-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60062-0)
- Moody, J. (2007). Antimicrobial Susceptibility testing. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In H. D. Isenberg (Ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (2nd Editio). Washington DC. USA: ASM Press.
- Morejón-García, M. (2010). *Klebsiella ozaenae* ., *MEDISAN*, 15(5), 568–572.
- Mosquera Tayupanta, T. (2014). *Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (Rosmarinus officinalis Lamiaceae) utilizados como conservantes en una formulación cosmética*. Universidad Politécnica Salesiana. Quito. Ecuador.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Muthu Lakshmi, T., Radha, R., & Jayshree, N. (2014). Formulation and Evaluation of Herbal Gel Conatining *Dalbergia sissoo* Roxb . Bark Extract. *Journal of Pharmaceutal Research and Clinical Practice*, 4(1), 53–57.
- Nagasaka, R., Chotimarkorn, C., Shafiquil, I. M., Hori, M., Ozaki, H., & Ushio, H. (2007). Antiinflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 615–619.
- Núñez, M. B., Torres, C. A., Aguado, M. I., Bela, A. J., & Dudik, H. N. (2012). Polyphenols and antimicrobial activity in extracts of *Lippia alba* (Mill .). *International Journal of Medicinal an Aromatic Plants*, 2(3), 361–368.

- O'leary, N., I, C. C., Martínez, S., Lu-Irving, P., Olmstead, R., & Múlgura, M. E. (2012). Evolution of morfological traits in Verbenaceae. *American Journal of Botany*, 99(11), 1778–1792. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3732/ajb.1200123>
- OMS. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved November 13, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- OMS, O. M. de la S. (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Organización Mundial de la Salud, O. (2016). Resistencia a los antibióticos. Retrieved May 31, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>
- Palomino-Yamamoto, M. (2001). Fisiología de la piel. *Revista Peruana de Dermatología*, 11(2). Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v11_n2/fisio_piel.htm
- Panwar, A. S., Upadhyay, N., Bairagi, M., Gujar, S., Darwhekar, G. N., & Jain, D. K. (2011). Emulgel: a review. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 1(3), 333–343.
- Papageorgiou, S., Varvaresou, A., Tsirivas, E., & Demetzos, C. (2010). New alternatives to cosmetics preservation. *Journal of Cosmetic Science*, 61(2), 107–123. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00609_3.x
- Passone, M. A., & Etcheverry, M. (2014). Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus section Flavi* and residual levels of these oils in irradiated peanut. *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.009>
- Patel, K., Jain, A., & Patel, K. D. (2013). Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins “delphinidin”: a concise report. *Journal of Acute Disease*, 2, 169–178.
- Patel, K. R., Patel, M. R., Mehta, T. J., Patel, A. D., & Patel, N. M. (2011). Formulation, Development and Evaluation of Mucoadhesive Buccal Patch of Carvedilol. *International Journal of Pharmagenesis*, 2(1), 31–41.
- Patel, V. F., Liu, F., & Brown, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 153(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.027>
- Patil, S. C., Gadade, D. D., & Rathi, P. B. (2015). Design, Development and Evaluation of Herbal Gel for Treatment of Psoriasis. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*,

-
- 2(1), 72–87. Retrieved from http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/49_JIPBSV2I111.pdf
- Pattnaik, A., Mukherjee, S., Sarkar, R., Halder, S., Sa, B., Mazumder, A., ... Sen, T. (2014). Hydrogel formulation of *Buchanania lanzan* Spreng-A focus on rheological properties. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 5(3), 118–125.
- Paun, G., Neagu, E., Moroeanu, V., Albu, C., Ursu, T. M., Zangfirescu, A., ... Radu, G. L. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant activities of the *Impatiens noli-tangere* and *Stachys officinalis* polyphenolic-rich extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 28(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.008>
- Peh, K. K., & Wong, C. F. (1999). Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 2(2), 53–61. <https://doi.org/10952770>
- Pereira de Carvalho, C. H., das Neves de Araújo Lima, E., dos Santos Pereira, J., & Costa Lima, K. (2011). Papel de los *Staphylococcus* Spp. en la mucositis oral: revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana*, 49(3). Retrieved from <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2011/3/art-23/>
- Pereira, L. B. (2014). Impetigo - Review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(2), 293–299. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142283>
- Perera, H. D. S. M., Samarasekera, J. K. R. R., Handunnetti, S. M., & Weerasena, O. V. D. S. J. (2016). In vitro anti-inflammatory and anti-oxidant activities of Sri Lankan medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 94, 610–620. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.009>
- Pérez Azahuanche, F., Rodríguez Ávalos, F., León Marrow, M. E., & Malca García, G. (2010). Mezcla de extractos de plantas medicinales: ¿ sinergismo o reacción química? *Pueblo Continente*, 21(1), 239–242. Retrieved from <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/530/492>
- Pérez Zamora, C., Torres, C., & Nuñez, M. (2018). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. *Molecules*, 23(3), 544. <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>
- Pessini, G. L., Goletz, F. B., Sanchez, N. R., Cortez, D. A. G., Dias Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2003). Avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica de extractos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(supl), 21–24. Retrieved from

www.scielo.br/pdf/rbfar/v13s1/a09v13s1.pdf

- Pierre Lana, P., & da Silva Martins, E. V. (2013). TOXICIDADE DE PRESERVANTES. *Anais V SIMPAC*, 5(1), 581–584.
- Pino, C. A., & Martínez, O. C. (2014). Nuevos emulsionantes poliacrílicos en la formulación de sistemas acuosos de limpieza: PemulenTM TR-2. España.
- Portmann, E., Nigro, M. M. L., Reides, C. G., Llesuy, S., Ricco, R. A., Wagner, M. L., ... Carballo, M. A. (2012). Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): Assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *International Journal of Toxicology*, 31(2), 192–202. <https://doi.org/10.1177/1091581812436726>
- Preis, M. K. (2014). Oromucosal film preparations for pharmaceutical use – formulation development and analytical characterization (pp. 8–16). Düsseldorf. Retrieved from https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-32499/Preis_Maren_Dissertation_pdfA.pdf
- Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo, P. (2013). América Latina y el Caribe: “Una superpotencia de la biodiversidad.” Retrieved November 23, 2018, from <http://www.undp.org/content/undp/es/home/presscenter/pressreleases/2010/12/02/amrica-latina-y-el-caribe-superpotencias-de-biodiversidad.html>
- PROSISA. (2005). *Farmacopea vegetal caribeña*. (L. Germosén-Robineau, Ed.) (Segunda Ed). León, Nicaragua: Editorial Universitaria, UNAM.
- Rajani, M., & Kanaki, N. S. (2008). Phytochemical standardization of herbal drugs and polyherbal formulations. In K. G. Ramawat & J. M. Merillon (Eds.), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 349–369). Springer.
- Rajesh, B., Saumya, D., Dharmajit, P., & Pavani, M. (2014). Formulation design and optimization of herbal gel containing *Albizia lebbek* bark extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 111–114.
- Rayo, O. E., & Guerrero, D. Q. (2014). Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(3), 17–38.
- Reichling, J., Landvatter, U., Wagner, H., Kostka, K.-H., & Schaefer, U. F. (2006). In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 222–228. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641106001330>

- Ricciardi, G., Ocampo, R., Lorenzo, D., Ricciardi, A., Badoni, A., & Dellacassa, E. (2009). Chemical variability of essential oils of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown growing in Costa Rica in Argentina. *Natural Products*, 4(6), 853–858. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/19634336>
- Rigter, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5, 37–42.
- Rivas Cruz, F. (2015). Sistema de adquisición de datos automatizado para pruebas mecánicas uniaxiales y triaxiales. In *Asociación Geotérmica Mexicana – Memorias del XXII Congreso Anual* (pp. 1–5). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281376092_Sistema_de_adquisicion_de_datos_automatizado_para_pruebas_mecanicas_uniaxiales_y_triaxiales
- Rodríguez, A. J. R., Pérez, R. L., Lafoucade, P. A., Escalona, A. J. C., & Iraizoz, C. A. (2014). Formulations of capsules from *Tamarindus indica* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(1).
- Rodríguez, I. C., Cerezo, A., & Salem, I. I. (2000). Sistemas de liberación Bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 115–128.
- Rondina, R. V. D., & Coussio, J. D. (1989). Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas (1). *Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA. Serie 2, Biología y Producción Vegetal*, VI(22). En guía de Trabajo Práctico N°2: Extracción y Fraccionamiento. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia. Cátedra de Farmacognosia. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
- Rosalina, W., & Dekker, F. J. (2014). Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoygenase Activity are Intimately Linked. *Cancers*, 6, 1500–1521. <https://doi.org/10.3390/cancers6031500>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Owen, S. C. (Eds.). (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Fifth Edit). London, UK: Pharmaceutical Press.
- Sánchez, J. R. (2013). Viaje hacia el interior de la piel. *Revista Sthetic & Academy*, 1, 42–48.
- Sarduy Bermúdez, L., & González Díaz, M. E. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002
- Satpathy, B., Sahoo, M., & Patra, S. R. (2011). formulation and evaluation of herbal gel containing essential oils of piper betle against skin infecting pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 373–378.

- Schroeder, M. A., López, A. E., & Sauer, M. V. (2005). Efecto de la fertilización de *Lippia turbinata* Gris. In *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Corrientes, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- Sena Filho, J. G., Düringer, J. M., Uchoa, D. E. A., Xavier, H. S., Barbosa Filho, J. M., & Braz Filho, R. (2007). Distribution of iridoid glycosides in plants from the genus *Lippia* (Verbenaceae): an investigation of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Natural Products Communications*, 2, 715–716.
- Sette-de-Souza, P. E., do Rego Carneiro, S. E., Macedo-Costa, M. R., Borges, S. B., da Rocha Medeiros, A., de Oliveira Fernandez, T. J., ... Costa Lima, K. (2014). Antibacterial activity and phytochemical screening of extracts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *African Journal of Microbiology Research*, 8(29), 2783–2787. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6791>
- Singh, S., & Rohilla, B. D. (2016). Formulation and Evaluation of Herbal Gel From Different Parts of *Cyamopsis Tetragonoloba* (L.) Taub. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 740–752.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Tapia Villanueva, C., & Sapag-Hagar, J. (1995). Metilcelulosa: sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 14(1), 41–47.
- Thormar, H. (2011). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. (H. Thormar, Ed.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2011). *Principios de Anatomía y Fisiología* (Eleventh E). México, DF.: Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V.
- Tsujimoto, M., Makiguchi, T., Nakamura, H., Murata, M., Sawada, Y., Oshima, K., & Yokoo, S. (2018). Staphylococcal scalded skin syndrome caused by burn wound infection in an infant: A case report. *Burns Open*, 2(3), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.burnso.2018.05.003>
- Vallejo Díaz, B. M., & Perilla, J. E. (2008). Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, 37(1), 33–61.

- Vallet-Regi, M., Balas, F., & Arcos, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(40), 7548–7558.
- Vega-Vela, N. E., Delgado-Ávila, W. A., & Cacón-Sánchez, M. I. (2013). Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 5–17. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652013000100002&script=sci_arttext&lng=es
- Vila, A. T., & Puig, L. (2003). Folliculitis y forunculosis. Clínica y tratamiento. *Farmacia Profesional*, 17(1), 78–81.
- Wangenstein, H., Samuelsen, A. B., & Malterud, K. E. (2004). Antioxidant activity in natural therapeutical drugs. *Life Science*, 65(4), 337–353.
- Wasihum, Y., Adraro, T., & Ali, S. (2014). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical constituents of leaf extract of *Lippia adoensis*. *Asia Pacific Journal of Energy and Environment*, 1(1), 43–55. Retrieved from <http://oaji.net/articles/2014/803-1398898486.pdf>
- Waysbort, D., McGarvey, D. J., Creasy, W. R., Morrissey, K. M., Hendrickson, D. M., & Durst, H. D. (2009). A decontamination system for chemical weapons agents using a liquid solution on a solid sorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1114–1121. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.083>
- Welin.Berger, K., Neelissen, J. A. M., & Bergenstahl, B. (2001). The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 309–318. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809870100118X>
- Wong, C. F., Yuen, K. H., & Peh, K. K. (1999). Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *International Journal of Pharmaceutics*, 178, 11–22.
- Yang, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36(6), 656–665. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv046>
- Ygartua, P., Arellano, A., Santoyo, S., & Martín, C. (1998). Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels, 7, 129–135.

- Zeñao, S., Alfredo, A., Dias, C., Saavedra, M. J., & Fernandes, C. (2017). Antibacterial potential of *Urtica dioica* and *Lavandula angustifolia* extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of Herbal Medicine, In Press*. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.05.003>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>

9. TRABAJOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

9.1 Trabajos en revista científicas

- Un artículo terminado aún sin publicar y otro artículo en proceso de redacción

9.2 Resúmenes presentados en eventos Científicos-Tecnológicos publicados en libros de resúmenes

1. Torres, Carola; Maurenzi, Daiana Rocío; Candia, Yazmín de los Ángeles; **Pérez Zamora, Cristina**; Nuñez, María Beatriz. Comparación del contenido fenólico y la actividad antioxidante de siete especies de la familia Bignoniaceae (poster). V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de Cromatografía. Bogotá, Colombia. **2016**. ISBN: 978-958-59491-0-2 URL: <http://socolquim.com/cipnat/MemoriasCIPNat2016.pdf>
2. **Pérez Zamora, Cristina**; Gassmann, Luciana; Sanchez, Cynthia; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Propiedades biológicas de dos extractos de la familia Verbenaceae y su combinación (ponencia). V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales, XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, VIII Congreso Colombiano de Cromatografía. Bogotá, Colombia. **2016**. ISBN: 978-958-59491-2. URL: <http://socolquim.com/cipnat/MemoriasCIPNat2016.pdf>
3. **Pérez Zamora, Cristina**; Torres, Carola; Nuñez, María Beatriz; Chiappetta, Diego. Actividad anticandidiásica in vitro de extractos de dos especies de lippia (Verbenaceae) (poster). VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA). Córdoba, Argentina. **2015**. ISSN: 2250-4079. URL: <http://www.safe-digital.org/archivos/2015/LIBRO%20DE%20RESUMENES%202015.pdf>
4. **Pérez Zamora, Cristina**; Martinez Medina, Juan J.; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Actividad antimicrobiana de fracciones del extracto etanólico de *Lippia turbinata* (ponencia). Reunión de Difusión de la Labor Docente. Científica y Tecnológica y de Extensión. Universidad Nacional del Chaco Austral Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina. **2015**. ISBN: 978-987-45711-4-4. URL: https://sicyt.uncaus.edu.ar/archivos/userfiles/libros_digitalizados/Libro_Digital_Reunion_de_Difusion_2015_UNCAUS.pdf
5. **Pérez Zamora, Cristina**; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Development, characterization and antibacterial activity of gels with extract of *Lippia turbinata* and *Lippia alba* (poster). 3^{era} Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. **2014**. E-ISSN: 0975-8232. URL:

<http://ijpsr.com/wp-content/uploads/2015/05/Proceedings-RICIFa2014-Cordoba-ARGENTINA.pdf>

6. **Pérez Zamora, Cristina**; Torres, Carola Analía; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Aislamiento de flavonoides a partir del extracto etanólico de *lippia turbinata* (Verbenaceae) (ponencia). Reunión de Difusión de la Labor Docente, Científica y Tecnológica y de Extensión. Universidad Nacional del Chaco Austral Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina. **2014**. ISBN: 978-987-45711-0-6. URL: https://sicyt.uncaus.edu.ar/archivos/userfiles/libros_digitalizados/Libro_digital_Reunion_de_Difusion_2014_UNCAUS.pdf

9.3 Trabajos presentados en eventos científicos tecnológicos no publicados

7. **Pérez Zamora, Cristina**; Chiappetta, Diego; Nuñez María B. Evaluación de la permeación transepitelial de polifenoles desde distintas formas farmacéuticas (ponencia). Reunión de Difusión de la Labor Docente, Científica y Tecnológica y de Extensión. Universidad Nacional del Chaco Austral. Presidencia Roque Sáenz Peña, chaco, Argentina. **2018**
8. **Pérez Zamora, Cristina**; Torres, Carola; Chiappeta, Diego; Nuñez, María Beatriz. Evaluación de excipientes para la vehiculización de extractos vegetales en formulaciones de uso tópico (poster). 23 Congreso Farmacéutico Argentino. Organizado por el Colegio de Farmacéuticos de Río Negro y la Confederación Farmacéutica Argentina. San Carlos de Bariloche, Argentina. **2017**.
9. **Pérez Zamora, Cristina**; Morettón, Marcela; Cynthia Sanchez; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Desarrollo y evaluación de formulaciones herbáceas con actividad antibacteriana a base de Sepigel (poster). 4ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. **2016**
10. **Pérez Zamora, Cristina**; Torres, Carola; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Análisis preliminar de flavonoides en fracciones del extracto de *Lippia turbinata* (Verbenaceae) (ponencia). I Reunión Argentina de Jóvenes Botánicos. Corrientes, Argentina. **2014**
11. **Pérez Zamora, Cristina**; Martínez Medina, Juan J.; Nuñez, María Beatriz; Chiappeta, Diego. Actividad antimicrobiana de fracciones conteniendo flavonoides del extracto etanólico de *Lippia turbinata*. 31 Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014). XXVII Congreso Peruano de Química. Sociedad Química de Perú (SQP). Lima, Perú. **2014**.